

„Immunhistochemische, zellbiologische und physiologische
in vivo Untersuchungen zum Apelin/APJ-System
in Hypothalamus und Hypophyse der Ratte“



Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Diplombiologe
Thomas Hatzelmann
aus München

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer: 1180)
als Dissertation angenommen am: 31.03.12

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Gerhard Heldmaier

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.12

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von April 2008 bis August 2011 in Giessen am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität unter der Leitung und in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger durchgeführt. Die Betreuung am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität wurde von Herrn Prof. Dr. Gerhard Heldmaier übernommen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel: „Immunhistochemische, zellbiologische und physiologische *in vivo* Untersuchungen zum Apelin/APJ-System in Hypothalamus und Hypophyse der Ratte“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Diese Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Thomas Hatzelmann)

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Sir Isaac Newton

Gewidmet meinen Eltern

Zusammenfassung

Der Hypothalamus repräsentiert die wichtigste Komponente des Zentralnervensystems (ZNS) zur Integration afferenter Signalinformationen und zur Regulation der Homöostase von Körperkerntemperatur, Wasser- und Elektrolythaushalt des Extrazellularraumes, circadianer Rhythmik sowie Energiehaushalt.

Das wichtigste Kerngebiet (Nucleus) des Hypothalamus zur Steuerung der genannten physiologischen Funktionen stellt der in der supraoptischen Region, in unmittelbarer Nähe zum dritten Hirnventrikel gelegene *Nucleus paraventricularis* (PVN) dar. Der PVN enthält zahlreiche neurosekretorische Zellen und weist darüber hinaus zahlreiche efferente und afferente neuronale Verknüpfungen zu anderen Struktureinheiten des Gehirns auf. Zusätzlich zum PVN kommt auch dem im Bereich der *Commissura anterior* gelegenen *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) eine bedeutende, integrative Funktion bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie der Körperkerntemperatur zu.

Bei der Regulation dieser Prozesse spielt neben klassischen und peptidergen Neurotransmittern auch das gasförmige Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO), produziert unter anderem von der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS), eine wesentliche neuromodulatorische Rolle. Auch für das apelinerge System, bestehend aus den verschiedenen, aktiven Fragmenten des Preproapelins (Apelin36, Apelin17 und Apelin13) und dem G-Protein gekoppelten Rezeptor APJ, wurde bereits ein zentral vermittelter Einfluss unter anderem auf die Temperaturregulation und auf die Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes beschrieben. Eine Expression sowohl der Apelinpeptide als auch des Rezeptors konnte bisher in peripheren Organen sowie im ZNS, und dabei hauptsächlich im Hypothalamus, gezeigt werden. Trotz zahlreicher Expressionsstudien fehlte jedoch bisher eine detaillierte Kartierung der Verteilung des Rezeptorproteins in Hypothalamus und Thalamus.

(1) Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Markierungen an coronalen Gehirnschnitten der Ratte wurde deshalb erstmalig eine detaillierte, semiquantitative Kartierung der Expression des APJ Proteins im Hypothalamus erstellt. Diese Untersuchung bestätigt einerseits die bereits auf mRNA-Ebene publizierte APJ-Expression in Strukturen wie PVN und *Nucleus supraopticus* (SON), konnte jedoch darüber hinaus in vielen Nuclei und/oder deren Substrukturen wie u.a. dem MnPO, dem medialen Teil des „Bed Nucleus“ der *Stria terminalis*, dem *N. praecommissuralis* und dem *N. dorsomedialis*

eine APJ-Expression zum ersten Mal auf Proteinebene für einzelne Neurone bzw. deren *Pseudopodia* nachweisen.

(2) Sowohl für den PVN als auch den MnPO wurde bereits eine Expression von nNOS in früheren Studien beschrieben. Zusätzlich dazu konnte in der Fachliteratur eine Vermittlung apelinergereffekte über NO etwa anhand der Modulation kardiovaskulärer Parameter in der Peripherie postuliert werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Co-Distribution und -Lokalisation von APJ und nNOS anhand immunhistochemischer Markierungen im Hypothalamus der Ratte untersucht. Dabei konnte u.a. im MnPO eine ausgeprägte Co-Distribution nitrerger Neurone und APJ-immunpositiver Faserstrukturen festgestellt werden. Bei der quantitativen Analyse der Expression von nNOS und APJ in Perikaryen des PVN und des SON hingegen war sogar mit ca. 40 % bzw. ca. 50 % markante zelluläre Co-Expression der beiden Moleküle nachweisbar. Aufgrund der ausgeprägten Co-Lokalisation und Co-Distribution in PVN und MnPO könnte somit NO als nachgeschaltetes Signalmolekül auch an der Vermittlung zentraler, apelinergereffekte Wirkmechanismen beteiligt sein.

(3) Zur *in vitro* Untersuchung Apelin-induzierter, intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen wurden aufgrund der ausgeprägten APJ-Rezeptorexpression sowohl MnPO- und PVN-spezifische neurogliale Primärkulturen als auch eine primäre Hypophysenzwischenlappenkultur (HZL) herangezogen. Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) als wichtigen *second* oder *third messenger* konnten für einzelne Zellen durch den Einsatz calciumbindender Fluorophore wie Fura-2 kontinuierlich erfasst werden (=Calcium-Imaging). Sowohl für Neurone als auch Astrozyten der MnPO- und PVN-spezifischen Kulturen ergab sich bei 2-9 % der Zellen, in PVN-spezifischen Mikrogliazellen hingegen bei 12 % eine direkte Responsivität in Form einer transienten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit der pyroglutamylierten Form von Apelin13 (PyrAp13) (10^{-6} mol/l). Wie bereits für andere Neuropeptide beschrieben, vermochte PyrAp13 darüber hinaus den Calciumeinstrom des klassischen Neurotransmitters Glutamat in nitrergen und vor allem nicht-nitrergen Zellen sowohl positiv als auch negativ zu modulieren. Diese modulatorische Wirkung könnte somit möglicherweise die zelluläre Grundlage für physiologische Funktionen des apelinergen Systems als neuer Neuromodulator im ZNS darstellen.

Neben der Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ als dem Apelin13 nachgeschaltetes Signal wurde in einigen Publikationen auch über die Involvierung der MAP-Kinasen *extracellular regulated kinase*

1/2 (ERK1/2) im apelinergen Signalweg in peripheren oder transfizierten Zellsystemen berichtet. In der Primärkultur des HZLs mit hoher nativer APJ-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit nach apelinergen Stimulation anhand von Western Blot Analysen jedoch keine Aktivierung der ERK1/2 beobachtet werden, möglicherweise bedingt durch eine bereits hohe Phosphorylierung vor der peptidergen Stimulation.

(4) Als weiterer wichtiger Aspekt der wissenschaftlichen Arbeit wurden *in vivo* physiologische Parameter nach intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Applikation von PyrAp13 (20 nmol) in der Ratte anhand telemetrischer Datenaufzeichnung untersucht. (A) I.c.v. mikroappliziertes PyrAp13 zeigte dabei keinen signifikanten Einfluss auf durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS, 100 µg/kg Körpergewicht) induzierte Komponenten des *sickness behavior* wie Anorexie, Adipsie und Lethargie. Jedoch führte es zu einer signifikanten Reduktion des LPS-induzierten Fiebers 3-6 und 6-9 Std. *post injectionem* und einem signifikanten erniedrigten Plasmaspiegel an Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) als prominenten proinflammatorischen Cytokin 2 Std. nach der Injektion. (B) Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit von APJ und dem Angiotensin II (AngII)-Rezeptor und einer *in vitro* bereits gezeigten Interaktion mit diesem, zeigte i.c.v. mikroappliziertes PyrAp13 jedoch *in vivo* keinen Einfluss auf durch die zentrale AngII-Applikation induzierte Trinkwasseraufnahme bzw. nukleäre Translokation des neuronalen Aktivitätsmarkers und Transkriptionsfaktors c-Fos. (C) Weiterhin zeigte PyrAp13 i.c.v. selbst beim Vergleich der Injektion vor der Aktivitätsphase mit der Inaktivitätsphase der Versuchstiere keinen Einfluss auf die circadiane Rhythmik telemetrisch erfasster Parameter wie Körpertemperatur, lokomotorische Aktivität und Futter- bzw. Wasseraufnahme.

Summary

The hypothalamus represents the most important component of the central nervous system (CNS) used for integrating afferent signaling information and regulating the homeostasis of body temperature, water and electrolyte balance of the extracellular space, circadian rhythm and energy metabolism.

The most important hypothalamic structure (nucleus) for regulating the above mentioned physiological functions is the *Nucleus paraventricularis* (PVN) of the preoptic region, which

is located closely to the third brain ventricle. The PVN consists of many neurosecretory cells and shows numerous efferent and afferent neuronal connections to other structural components of the brain. In addition to the PVN, the *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO), which is located close to the *Commisura anterior*, displays a critical integrative function for regulating water and electrolyte balance, as well as regulating body temperature.

Besides other peptides and classical neurotransmitters, the gaseous transmitter nitric oxide (NO), produced by the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) amongst other substances, plays an essential neuromodulatory role in regulating water and electrolyte balance and body temperature. The apelinergic system, consisting of several active fragments of the preproapelin (apelin36, apelin17 and apelin13) and the G-protein coupled receptor, APJ, has been reported to also centrally modulate body temperature and water and electrolyte balance. Expression of apelin peptides and their receptors has been shown in peripheral organs and the CNS, in particular in the hypothalamus. Despite many expression studies having been undertaken, the detailed mapping of the APJ protein distribution in hypothalamus and thalamus remains to be determined.

(1) The present thesis therefore includes, for the first time, a detailed semi-quantitative immunohistochemical mapping of the APJ protein on coronal hypothalamic rat brain slices and confirms published APJ mRNA expression in structures like the PVN and *Nucleus supraopticus* (SON). However, for many structures and/or nuclei like the MnPO or the medial division of the bed nucleus of the stria terminalis, the *N. praecommissuralis* and the *N. dorsomedialis*, APJ protein has been described for the first time in single neurons or *pseudopodia*.

(2) The expression of nNOS has been reported in both the PVN and MnPO previously. Additionally it has been postulated that apelinergic effects, for example on the cardiovascular system, could be mediated by NO. Therefore, the present work analyzed the possible immunohistochemical codistribution and colocalization of APJ and nNOS in the hypothalamus. In this study the MnPO, amongst other brain structures, showed distinct codistribution of nitrergic neurons and APJ immunopositive fiber structures. Quantitative analysis of the PVN and SON perikarya revealed about 40 % and, 50% cellular colocalization of both molecules. Due to this prominent colocalization and codistribution in the PVN and MnPO, NO could be involved as a downstream signaling molecule in mediating central apelinergic functions.

(3) Because of the distinctive expression of APJ in the MnPO and PVN, specifically the primary neuroglial cultures of both nuclei and additionally primary intermediate lobe pituitary (HZL) cultures, with high native expression of APJ, these cultures were used to analyze apelin induced intracellular signal transduction *in vitro*. Changes of intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$), which are important second or third messengers, were monitored in single cells by calcium binding fluorophors fura-2 (=calcium imaging). Neurons and astrocytes of the MnPO and PVN specific cultures exhibited 2-9 % specific microglial cells in the MnPO and 12% specific microglial cells in the PVN. Of the MnPO and PVN cell cultures, 12 % directly responded with changes in ($[Ca^{2+}]_i$) when stimulated with the pyroglutamate modified form of apelin13 (PyrAp13) (10^{-6} mol/l). As described for other neuropeptides, PyrAp13 was able to positively and negatively modulate the influx of calcium caused by the classical neurotransmitter glutamate in mainly non-nitregic cells, but also nitregic cells. This modulatory function of PyrAp13 could provide evidence for the cellular basis of apelin as a novel CNS neuromodulator.

Besides analysis of $[Ca^{2+}]_i$ as a downstream signal of the apelinergic system, some reports showed involvement of extracellular regulated kinase (ERK)1/2 in apelinergic signaling in peripheral or transfected cell systems. In the present work no activation of ERK1/2 was detected in primary HZL cultures with highly native APJ expression, using Western Blot analysis. The lack of ERK1/2 expression may be due to already high levels of phosphorylation before stimulation.

(4) As a next important component of the present work, *in vivo* parameters were monitored in rats by radiotelemetry after intracerebroventricular (i.c.v.) micro application of PyrAp13 (20 nmol). (A) Microinjection of PyrAp13 i.c.v. induced no significant changes in bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced sickness behavior, including anorexia, adipsia and lethargy. However, it significantly reduced LPS-induced fever 3-6 and 6-9 h after injection. Moreover, it also led to a significant reduction in plasma levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), a prominent proinflammatory cytokine, 2 h after injection. (B) Despite a high sequence of similarity between the APJ and the Angiotensin II (AngII) receptor and a proven interaction of both *in vitro*, i.c.v. microinjected PyrAp13 exhibited no influence on water intake *in vivo* or nuclear translocation of the transcription factor and neuronal activity marker c-Fos, induced by i.c.v. AngII. (C) Furthermore i.c.v. PyrAp13 showed no influence on telemetrically recorded parameters, such as body temperature, locomotor activity and food/water intake of animals.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
1. Der Hypothalamus als Regler physiologischer Funktionen	1
2. Der Apelin-Rezeptor APJ als G-Protein gekoppelter Rezeptor	5
3. Apelin und Apelinformen	9
4. Physiologische Funktionen des apelinergen Systems	13
4.1 Apelin/APJ und die Homöostase des kardiovaskulären Systems	13
4.2 Apelin/APJ und die Regulation des Energiehaushaltes	15
4.3 Apelin/APJ und die HPA-Stressachse	16
4.4 Apelin/APJ und die Temperaturregulation	16
4.5 Apelin/APJ und die Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes	17
5. Apelinerge, intrazelluläre Signaltransduktion	18
6. Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und NOS-Isoformen	19
7. Fragestellungen der wissenschaftlichen Arbeit	22
B. Material und Methoden	24
I. Material	24
1. Geräte	24
2. Chemikalien und Substanzen	26
3. Medikamente und OP-Bedarf	28
4. Antikörper	29
4.1 Primärantikörper	29
4.2 Sekundärantikörper	30
5. Ge- und Verbrauchsmaterial	30
5.1 Tierhaltung	30
5.2 Immunhistochemie und –cytochemie	30
5.3 Zellkultur und Calcium-Imaging	31
5.4 Western Blot	31
5.5 <i>In vivo</i> Versuche	31
5.6 RT-PCR	32
5.7 TNF- α und IL-6 Bioassays	32
6. Software	32
II. Versuchstiere	32
III. Methoden	33
1. Primäre Zellkultur	33
1.1 Neurogliale Primärkulturen des <i>Nucleus paraventricularis</i> (PVN), des <i>Nucleus praeopticus medianus</i> (MnPO) und des <i>Nucleus arcuatus</i> (ARC)	33

1.1.1	Verwendete Puffer und Lösungen	35
1.1.2	Anfertigung der Frischgewebeschnitte.....	36
1.1.3	Identifikation des PVN im Gewebeschnitt	38
1.1.4	Histologische Kresylviolett (KV)-Färbungen	39
1.1.4.1	Verwendete Puffer und Lösungen	39
1.1.4.2	Hypothalamische KV-Gefriergewebeschnittserien der neonatalen Ratte	39
1.1.4.3	Kresylviolett-färbung neonataler potentieller PVN Gehirnfri- schgewebeschnitte	40
1.1.5	Präparation der Zellen	40
1.1.6	CRF-Markierung in der neuroglialen PVN-Kultur	41
1.2	Primärkultur des Hypophysenzwischenlappens (HZL)	41
1.2.1	Verwendete Puffer und Lösungen	42
1.2.2	Präparationsprotokoll	42
2.	Ca ²⁺ -Ratio Imaging: Untersuchungen zur apelinergen Ca ²⁺ -Signaltransduktion	46
2.1	Grundlagen der Messtechnik.....	46
2.2	Durchführung der Messungen	49
2.2.1	Verwendete Puffer und Lösungen	49
2.2.2	Versuchsvorbereitung.....	50
2.2.3	Versuchsdurchführung	52
2.2.4	Datenevaluierung	53
3.	<i>In vivo</i> Experimente	54
3.1	Implantation von i.c.v. Kanüle und Telemetriesender	55
3.2	Intracerebroventrikuläre Mikroapplikationen	58
3.2.1	Verwendete Puffer und Lösungen	58
3.2.2	Methode.....	58
3.3	Telemetrie.....	59
3.3.1	Der Sender.....	59
3.3.2	Die telemetrische Versuchsanordnung.....	60
3.4	Studiendesign einzelner Experimente	62
3.4.1	Verifizierung der korrekten Platzierung der i.c.v. Kanüle	62
3.4.2	Einfluss von i.c.v. PyrAp13 auf Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Parameter des sickness behavior	62
3.4.3	Einfluss von i.c.v. PyrAp13 auf AngII-induziertes Trinkverhalten und Induktion der nukleären c-Fos Translokation	64
3.4.4	Einfluss von i.c.v. PyrAp13 auf die circadiane Rhythmik physiologischer Parameter.....	66
3.5	Datenevaluation von Futter-/Wasseraufnahme und telemetrischen Daten	68
4.	Immunhisto- und -cytochemische Untersuchungen	69
4.1	Gewebevorbereitung für die Immunhistochemie	70

4.1.1 Transkardiale Perfusion.....	71
4.1.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen	71
4.1.1.2 Durchführung	71
4.1.2 Anfertigung coronaler Cryostat-Gewebeschnitte.....	73
4.2 Immunhistochemische Markierungen an Gehirngewebeschnitten.....	74
4.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	74
4.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung auf Inkubationsplatten.....	75
4.2.3 Immunfluoreszenzmarkierung „Free floating“ Methode	77
4.2.4 Biotinverstärkung des Fluoreszenzsignals	78
4.2.5 Semiquantitative Kartierung des APJ-Rezeptors	79
4.2.6 Co-Expression von APJ und nNOS	79
4.3 Cytoimmunfluoreszenzmarkierung in den Primärkulturen	80
4.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen	80
4.3.2 Durchführung	80
4.3.3 Zelltypbestimmung nach Ca ²⁺ -Imaging Analyse	81
4.3.4 Charakterisierung der primären Hypophysenzwischenlappen (HZL) kultur ..	83
4.4 Kontrollen.....	84
4.4.1 Kontrollen ohne Erstantikörper	84
4.4.2 Doppelmarkierung mit zweitem Primärantikörper.....	84
4.4.3 Antigen-Absättigung des APJ-Antikörpers.....	85
5. Fluoreszenzmikroskopie.....	86
6. SDS-PAGE und Western Blot Analyse für APJ im Hypophysenzwischenlappen (HZL) der Ratte	87
6.1 Verwendete Puffer und Lösungen	87
6.2 Lyse des Gewebes und Proteinbestimmung durch Bradford Assay	89
6.3 Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot	90
6.4 Der apelinerge Signaltransduktionsweg in Hypophysenzellen: ERK1/2-Phosphorylierung.....	93
6.4.1 Verwendete Puffer und Lösungen	93
6.4.2 Stimulationsprotokoll und Lysis der Zellen	94
7. RT-PCR.....	96
7.1 Verwendete Puffer und Lösungen	96
7.2 Lysierung des Zellkulturmaterials.....	96
7.3 RNA-Isolierung	97
7.4 qRT-PCR zur Quantifizierung der APJ- und Apelin-spezifischer mRNA	98
8. Cytokinassays: IL-6 und TNF- α	99
8.1 Der TNF- α Assay	100
8.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen	100

8.1.2 Methode und Assay-Durchführung	100
8.2 Der IL-6 Assay	102
8.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	102
8.2.2 Assay-Durchführung	103
8.3 Messung der bioaktiven Cytokine IL-6 und TNF- α im Überstand der neuroglialen PVN und MnPO-Kulturen	103
8.4 Evaluation der Cytokindaten	104
C. Ergebnisse	105
I. Immunhistochemie für Apelinpeptide im Zentralnervensystem der Ratte	105
1. Apelin17	105
2. Apelin13	105
3. Vergleich der Apelinexpression in Wistar- und Sprague Dawley	108
II. Immunhistochemischer Nachweis des APJ-Rezeptors.....	109
1. Validierung der Antigenspezifität des APJ-spezifischen Antikörpers	109
1.1 Immunhistologische Immunfluoreszenzmarkierung für APJ im Gehirnschnitt der Ratte.....	110
1.2 Immunocytochemische Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung für APJ in der HZL- Primärkultur.....	111
1.3 Kontrollrecherche zur Antigenspezifität des APJ-R Antikörpers	114
2. Western Blot Analyse der APJ-Expression im Hypophysenzwischenlappen (HZL)	115
3. Apelin- und rAPJ-spezifische RT-PCR.....	116
4. Immunhistochemische APJ-spezifische Markierungen im ZNS der Ratte	118
4.1 Semiquantitative Kartierung des APJ-Rezeptors in thalamischen, hypothalamischen und anderen Gehirnstrukturen	118
4.2 Immunhistochemischer Nachweis der APJ-Expression in der Hypophyse	123
5. Immunocytochemische, APJ-spezifische Markierungen in der neuroglialen Nucleus arcuatus (ARC)-Primärkultur	124
III. Co-Expression des APJ-Rezeptors mit nNOS und Neuropeptiden.....	126
1. Co-Expression des APJ-Rezeptors mit nNOS in hypothalamischen Kerngebieten... ..	126
2. Co-Expression des APJ-Rezeptors mit Neuropeptiden in der HZL-Kultur	132
IV. Funktionale Studien in der Zellkultur	137
1. PVN- und MnPO-angereicherte neonatale Primärkultur	137
1.1 Modulation der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) nach Apelin- Stimulation	137
1.2 Apelinerge Modulation des glutamatergen Antwortverhaltens	139
1.3 Apelinerge Modulation des glutamatergen Calciumsignals in Zellen mit (nicht) nitrerem Phänotyp	145
1.4 PyrAp13 und die Freisetzung LPS-induzierter Cytokine in den neuroglialen Primärkulturen.....	147

2. Apelinerge Aktivierung von ERK1/2 in der primären Hypophysenzwischenlappenkultur	150
V. Funktionale <i>in vivo</i> Studien	152
1. Modulierende Wirkung von zentralem PyrAp13 auf LPS-induzierte Komponenten des <i>sickness behavior</i>	152
1.1 Wirkung von i.c.v. mikroappliziertem PyrAp13 auf die Körperkerntemperatur unter Basalbedingungen sowie LPS-induziertem Fieber	155
1.2 Wirkung von i.c.v. mikroappliziertem PyrAp13 auf die allgemeine lokomotorische Aktivität	156
1.3 Wirkung von i.c.v. PyrAp13 auf die Futter-/Wasseraufnahme und die LPS-induzierte Anorexie/Adipsie	157
1.4 Wirkung von i.c.v. mikroappliziertem PYrAp13 auf die Freisetzung proinflammatorischer Cytokine	160
2. Modulierende Wirkung von zentralem i.c.v. PyrAp13 auf AngII-induziertes Trinkverhalten und Induktion von c-Fos	161
2.1 Trinkverhalten	161
2.2 Expression und Translokation des Transkriptionsfaktors c-Fos	163
3. Modulierende Wirkung von zentralem PyrAp13 auf die circadianen Rhythmen von Körperkerntemperatur, Futter-/Wasseraufnahme und lokomotorischer Aktivität	169
3.1 Modulation der circadianen Rhythmik der Körperkerntemperatur	169
3.2 Modulation der nächtlichen Futter-/Wasseraufnahme	171
3.3 Modulation der lokomotorischen Aktivität	175
D. Diskussion	176
I. Nachweis von Apelin auf Proteinebene	176
II. Nachweis des Apelinrezeptors auf Protein- und mRNA-Ebene	178
1. Neuroanatomische Betrachtungen zur Funktion von Apelin/APJ im ZNS	181
2. Histologische und funktionale Aspekte zur Expression von APJ und Apelin in der Hypophyse	189
3. Mögliche Interaktion zwischen Apelin/APJ und NO im ZNS	190
III. Untersuchungen apelinerges Signalkaskaden	200
1. Funktionale Untersuchungen zur Rolle von Apelin/APJ an PVN- und MnPO-spezifischen neuroglialen Primärkulturen mittels Ca^{2+} -Imaging	200
2. Apelin-induzierte ERK 1/2-Phosphorylierung mittels Western Blot Analyse in der primären HZL-Kultur	203
IV. <i>In vivo</i> Untersuchungen zur Auswirkung zentraler (i.c.v.) Applikationen von PyrAp13	205
V. Schlussfolgerungen	211
E. Literatur	214
F. Publikationen	238

E. Abkürzungsverzeichnis.....	239
G. Danksagung	244

A. Einleitung

1. Der Hypothalamus als Regler physiologischer Funktionen

Der Hypothalamus als ventralster Teil des *Diencephalon* liegt rostral des *Mesencephalon* und caudo-ventral des *Prosencephalon* und wird vom Thalamus (dorsal), der *Lamina terminalis* (rostral) und dem *Corpus mammillare* (caudal) begrenzt, sowie sagittal durch den dritten Hirnventrikel (V III) geteilt. Obwohl der Hypothalamus beim erwachsenen Menschen nur 0,3 % des Gesamtgewichts des Gehirns ausmacht, spielt er als archaische Gehirnstruktur eine essentielle Rolle bei der Kontrolle lebenswichtiger physiologischer Funktionen. So ist er die wichtigste Region zur Integration und Regulation der Homöostase des Wasser- und Elektrolytgehaltes der extrazellulären Körperflüssigkeit, der Körperkerntemperatur, der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushaltes. Weiterhin kontrolliert er sexuelles Verhalten, Reproduktion und die Reaktion auf Stress und gilt als das Koordinationszentrum zur Synchronisation circadianer Rhythmen. Von rostral nach caudal wird der Hypothalamus neuroanatomisch in die anteriore oder supraoptische, die mittlere oder tuberale und die posteriore Region unterteilt. Diese enthalten jeweils morphologisch und physiologisch distinkte Nuclei und Regionen.

Die posteriore Region enthält dabei das bereits erwähnte *Corpus mammillare*, welches eine wichtige Komponente für die Verknüpfung von Emotion und Gedächtnis darstellt. Die tuberale Region hingegen beinhaltet mit dem an der Basis des V III gelegenen *Nucleus arcuatus* (ARC) eines der wichtigsten Kerngebiete zur Regulation des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme (siehe Review: Morton et al., 2006). Die anteriore/supraoptische Region enthält weitere, für die Regulation physiologischer Funktionen relevante Kerngebiete. So ist der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) der Sitz der circadianen Uhr im Säugetiergehirn (Stephan und Zucker, 1972; Moore und Eichler, 1972) und dient der Synchronisation circadianer Rhythmen in Physiologie und Verhalten. Das wichtigste regulatorische Schaltzentrum des Hypothalamus, ebenfalls in der supraoptischen Region gelegen, stellt der *Nucleus paraventricularis* (PVN) dar. Er spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Kontrolle kardiovaskulärer Parameter, der Wasser-, Elektrolyt- und Energiehomöostase sowie der Reaktion auf Stress (siehe Reviews: Herman et al., 2003; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Morton et al., 2006). Der PVN besitzt Efferenzen und Afferenzen zu vielen anderen Teilen

des Gehirns und enthält zahlreiche neurosekretorische Zellen. Afferente Projektionen erhält der PVN dabei unter anderem vom limbischen System, der *Amygdala*, der *Medulla oblongata* und zahlreichen hypothalamischen Regionen und Nuclei. Dazu zählen unter anderem der ARC, SCN, *Nucleus supraopticus* (SON), *Nucleus ventromedialis* (VMH), und die circumventrikulären Organe (CVOs), namentlich das *Organum subfornicale* (SFO) und das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) (Silverman et al., 1981). Weiterhin projizieren efferente Nervenfasern vom PVN unter anderem zum Hypophysenhinterlappen (HHL), der *Eminentia mediana* und zu autonomen Nuclei der *Medulla oblongata* und des Rückenmarks, welche durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems auch an der Regulation kardiovaskulärer Funktionen beteiligt sind (Pyner, 2009).

Die paarig um den V III angeordnete, schmetterlingsförmige Struktur des PVN kann morphologisch und funktional in eine magnozelluläre, eine parvozelluläre und eine parvozellulär, periventrikuläre Zone unterteilt werden (*Abbildung 1B*). Die magnozellularen Zellen des PVN haben neuroendokrine Funktionen und sind zusammen mit denen des SON an der Regulation der efferenten, humoralen Flüssigkeitshomöostase sowie der Reproduktion beteiligt. Sie sezernieren die Nonapeptide Vasopressin und Oxytocin (Landgraf et al., 1990), welche über axonalen Transport zum Teil im Bereich der *Eminentia mediana* in das Pfortadersystem der Hypophyse, größtenteils aber im Bereich des Hinterlappens der Hypophyse (HHL) in Vesikeln gespeichert und dort ins Blut abgegeben werden (Brownstein et al., 1980). Oxytocin ist bekannt für seine wesentliche Rolle bei der Laktation und dem Geburtsprozess. Neuere Studien weisen ihm aber auch eine wichtige Bedeutung an der Steuerung menschlichen Sozialverhaltens zu (siehe Review: Lee et al., 2009). Vasopressin hingegen hat eine essentielle Bedeutung bei der Kontrolle der Osmolalität des Blutes (Dunn et al., 1973; Verbalis, 2007), da es unter anderem direkt die Wasserrückresorption in der Niere regulieren kann und deshalb auch als antidiuretisches Hormon bezeichnet wird (Knepper, 1997).

Neben der Regulation der Wasserhomöostase hat der PVN eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von und der Reaktion des Organismus auf Stress und bildet einen zentralen Bestandteil der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse). Diese ist ein neuroendokrines System, welches neben der Regulation von Stress an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen und auch pathophysiologischen Zuständen beteiligt ist (Reviews: Ulrich-Lai und Herman, 2009; Chrousos, 2009). Ihre Hauptkomponenten sind (1) der

hypothalamische PVN, welcher durch die Sekretion von *Corticotropin-releasing-factor* (CRF) aus parvozellulären und Vasopressin aus magnozellulären Neuronen über die *Eminentia mediana* die Freisetzung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) aus der (2) Adenohypophyse stimuliert, welches schließlich aus der (3) Nebennierenrinde die Sezernierung von Corticosteron bzw. Cortisol stimuliert (Chrousos, 2009).

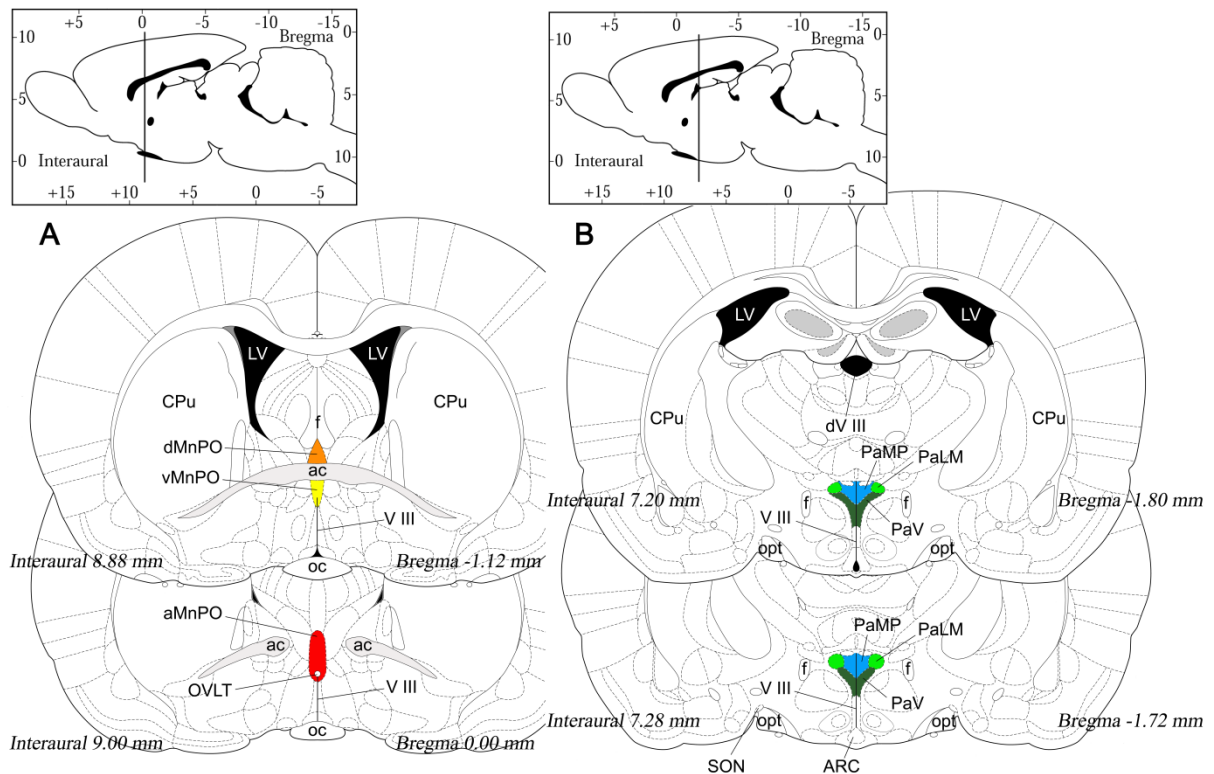


Abbildung 1: Schematische Darstellung coronaler Gehirnschnitte der Ratte mit Nucleus praeopticus medianus (MnPO) und Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN).

Darstellung der coronalen Schnittebene in der jeweiligen Lateralansicht des Rattengehirns (oben) und Distanzangaben zu Bregma und der interauralen Entfernung. (A) Darstellung der über der Commissura anterior (ac) liegenden dorsalen (dMnPO, **orange**), der entsprechend unterhalb der ac lokalisierten ventralen (vMnPO, **gelb**) und der zwischen der noch nicht geschlossenen ac befindlichen anterioren (aMnPO, **rot**) Substruktur des MnPO. CPu= Caudate putamen; LV= Lateralventrikel, oc= Chiasma opticum; OVLT= Organum vasculosum laminae terminalis; V III= 3.Ventrikel (B) Darstellung des PVN mit magnozelliger (PaLM, **hellgrün**), parvozellulärer (PaMP, **blau**) und periventriculärer (PaV, **dunkelgrün**) Komponente der Struktur. ARC= Nucleus arcuatus; dV III= dorsaler 3.Ventrikel; f= Fornix; SON= Nucleus supraopticus; opt= Nervi optici; (Verändert nach Paxinus und Watson, 2005).

Ein weiteres wichtiges Kerngebiet des anterioren Hypothalamus für die Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes ist der *Nucleus preopticus medianus* (MnPO). Dieses Kerngebiet kann in mehrere neuroanatomische Substrukturen unterteilt werden. Der anteriore MnPO erstreckt sich dabei als sagittal-zentral angeordnetes Kerngebiet, oberhalb des sich gerade öffnenden V III, zwischen den beiden Schenkeln der noch nicht geschlossenen *Commissura anterior* (Abbildung 1A). Im Gegensatz dazu umfassen dorsale und ventrale Anteile des MnPO die dann geschlossene *Commissura anterior*. Der MnPO spielt neben den beiden sensorischen CVOs OVLT und SFO eine wichtige Rolle bei der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes. Er besitzt unter anderem Afferenzen vom SFO, OVLT, der *Area preopticus medialis* (MPA) und der *Medulla oblongata* (Saper und Levisohn, 1983b; Chiba und Murata, 1985) und efferente Projektionen unter anderem zum SON und dem parvozellulären Teil des PVN (Sawchenko und Swanson, 1983; Oldfield et al., 1991b). Läsionen in der antero-ventralen Region des V III, welche u.a. den ventralen MnPO enthalten, führten bei Ratten und Hunden zu permanenter oder temporärer Adipsie (Anderson und McCann, 1956; Lind und Johnson, 1983; Marson et al., 1985). Zusätzlich konnte sowohl Dehydrierung (McKinley et al., 1994; Patronas et al., 1998) als auch die intravenöse Injektion von hypertoner NaCl-Lösung bei Ratten (Oldfield et al., 1991a) eine ausgeprägte Expression des Transkriptionsfaktors und *immediate early* Gens c-fos im SON, PVN, OVLT, SFO und MnPO induzieren. Aufgrund seines Bezugs zu synaptischer Aktivierung (Herdegen und Leah, 1998) wird die zelluläre Expression des Fos-Proteins sowie vor allem dessen Translokation in den Zellkern als neuronaler Aktivitätsmarker angesehen (Rowland, 1998).

Neben der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes ist der MnPO auch an der Regulation der Körperkerntemperatur beteiligt (Gerstberger et al., 2001). So konnte anhand von Ableitungen an Gewebeschnitten eine Sensitivität der MnPO-Neurone für Temperaturänderungen und Änderungen der Osmolalität festgestellt werden (Travis und Johnson, 1993). Weiterhin führte bei Ratten auch eine Wärmeexposition zu erhöhter c-Fos-Expression im MnPO (Maruyama et al., 2003). Die Kombination aus osmotischem Reiz und Temperaturstimulation bedingte sogar einen additiven Effekt der c-Fos-Expression (Patronas et al., 1998).

2. Der Apelin-Rezeptor APJ als G-Protein gekoppelter Rezeptor

An Guanin-Nucleotid-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind in der Plasmamembran lokalisiert und für einen Großteil der Liganden-induzierten Signaltransduktion über Zellmembranen verantwortlich. Die circa 800 unterschiedlichen Vertreter dieser Klasse von Rezeptoren verteilen sich auf fünf Haupt- und über 100 Subfamilien. Je nach Rezeptortyp können eine Vielzahl von diversen Ligandenklassen und -arten zu einer Aktivierung der GPCRs führen. Als größte Proteinfamilie im Genom des Menschen stellen sie einen wichtigen Angriffspunkt für Pharmaka dar, und schätzungsweise mehr als ein Viertel aller Pharmaka haben GPCRs und/oder ihre Liganden zum Ziel (Overington et al., 2006).

Charakteristisch für die GPCRs ist die ihnen gemeinsame Grundstruktur aus sieben transmembranalen Domänen (7TM), weshalb sie auch als 7TM Rezeptoren bezeichnet werden. Diese Bereiche sind jeweils über extrazelluläre und intrazelluläre Aminosäuresequenzen (=loops) miteinander verbunden (*Abbildung 2*). Das N-terminale Ende des Rezeptors befindet sich meist im Extrazellularbereich, der C-Terminus im intrazellulären Kompartiment. Ein weiteres Charakteristikum für die GPCRs ist das namensgebende G-Protein. Es besteht aus drei Untereinheiten (α , β , γ), wobei die α - und β -Untereinheiten membrangebunden sind. Die α -Untereinheit bindet im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat (GDP). In diesem Zustand liegt der ganze G-Proteinkomplex in der Nähe des Rezeptors vor. Nach der Bindung des Liganden (Hormon, Transmitter) am Rezeptor und der damit einhergehenden Konformationsänderung wird die α -Untereinheit aktiviert und bindet dann Guanosintriphosphat (GTP). Dadurch dissoziiert sie vom Rezeptor und dem Dimer der β -/ γ -Untereinheiten. Beide nun vom Rezeptor getrennten Teile des G-Proteins können jetzt mit weiteren Komponenten unterschiedlicher Signalkaskaden interagieren und somit das Signal weiterleiten.

APJ, der Rezeptor des apelinergen Systems, wurde 1993 zum ersten Mal beschrieben und enthält bei einer Länge von 380 Aminosäuren die für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor typischen, sieben transmembranalen Domänen (O'Dowd et al., 1993). In der gleichen Publikation konnte für das entsprechende Gen beim Menschen ein *Locus* auf dem Chromosom 11, und bei 30 % der Gesamt-Sequenz und 54 % der Sequenz in den transmembranalen Domänen eine relativ hohe Homologie zum Angiotensin II Rezeptor Typ 1

(AT1R) bestimmt werden (Abbildung 3). Trotz der hohen Sequenzhomologie wurde jedoch keine Bindungsaktivität von Angiotensin II (AngII) an einer mit APJ transfizierten Fibroblasten-Zelllinie nachgewiesen (O'Dowd et al., 1993). Im Gegenzug konnte einige Jahre später ebenfalls an transfizierten *human embryonic kidney* (HEK)293-Zellen belegt werden, dass Apelin13 nicht an den AT1R binden kann (Chun et al., 2008).

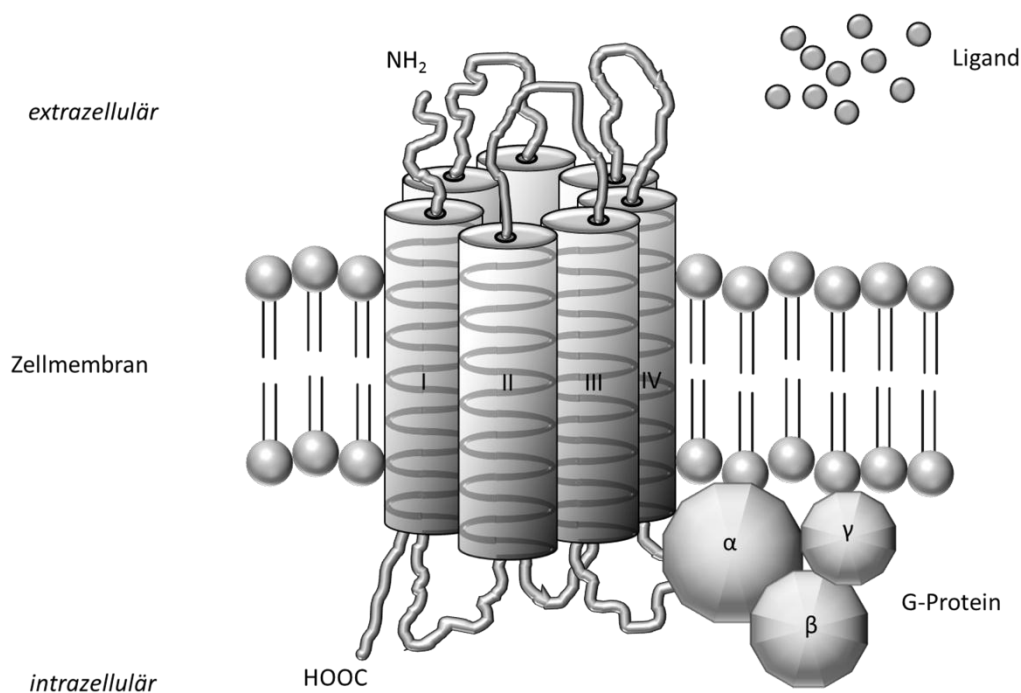


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines 7-transmembranalen (7TM), G-Protein gekoppelten Rezeptors in der Zellmembran.

Die transmembranalen Helices (I-VII) verbinden die extrazellulären Domänen an denen sich auch der N-terminale Teil des Rezeptors befindet mit dem intrazellulären Teil des Rezeptors mit C-Terminus und angekoppeltem G-Protein mit α -, β - und γ -Untereinheit.

Trotz all dieser Erkenntnisse blieben jedoch mögliche physiologische Funktionen des APJ-Rezeptors und der zu APJ passende Ligand zunächst unbekannt; der APJ-Rezeptor galt deshalb als sogenannter *orphan* Rezeptor. Auf der Suche nach der Funktion des Rezeptors wurde dieser 1998 zunächst unter anderem als alternativer Co-Rezeptor für den Typ I des humanen Immundefizienzvirus (HIV) vorgeschlagen (Edinger et al., 1998; Hoffman et al., 1998). Im selben Jahr berichteten Tatemoto et al. (1998) schließlich über die Isolation des endogenen Peptidliganden für APJ und nannten ihn Apelin für *APJ endogenous ligand*.

Einige Jahre später konnten anhand der Analyse der Aminosäuresequenz des APJ-Rezeptors der Ratte unter anderem zwei N-Glykosylierungsstellen und die zur Ausbildung möglicher Disulfidbrücken wichtigen Cysteine in allen vier extrazellulären Bereichen des Rezeptors

Abbildung 3: Alignment der Aminosäuresequenzen des APJ und Angiotensin II Rezeptors *Typ1A (Agtr1)* der Ratte.

Eine entsprechende Kernlokalisierung des Rezeptors konnte das erste Mal in Untersuchungen an einer transfizierten Medullablastoma-Zelllinie nachgewiesen werden (Lee et al., 2004). Neben der menschlichen Sequenz wurde APJ bisher zusätzlich für Rhesus Affe, Schimpanse, Maus, Ratte, Kuh, Krallen- und Ochsenfrosch sowie Zebrafisch cloniert und beschrieben. Die Sequenzen des APJ Proteins von Maus und Ratte zeigten dabei im Vergleich zur Sequenz des

humanen APJ eine ausgeprägte Sequenzhomologie von 91 % bzw. 89 % (De Mota et al., 2000).

Erste Studien zur Organ-Verteilung der mRNA des APJ-Rezeptors in der Ratte wiesen auf eine starke Expression in Lunge und Herz, sowie auf niedrigerem Niveau auch in Skelettmuskel, Niere, Ovar, Uterus und Leber, und somit auf eine breite Verteilung in der Peripherie hin (O'Carroll et al., 2000; De Mota et al., 2000). In aktuelleren Publikationen konnte APJ-spezifische mRNA auch im Fettgewebe beim Menschen nachgewiesen werden (Sorhede et al., 2005; Dray et al., 2010).

Bezüglich des zentralen Nervensystems (ZNS) konnte von mehreren Arbeitsgruppen im Hypothalamus übereinstimmend eine intensive Markierung für APJ-spezifische mRNA im PVN sowohl in dessen magno- als auch parvzellulären Bereichen, sowie im SON festgestellt werden (Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; De Mota et al., 2000). Weiterhin konnte APJ-spezifische mRNA im *Bulbus olfactorius*, *Gyrus dentatus*, Pinealorgan, *Cortex piriformis*, den *Insulae terminalis*, *Tuberculum olfactorius*, Ammon's Horn, der Zentralen Grauen Substanz, der *Pars compacta* der *Substantia nigra* und im *Nucleus raphe dorsalis* nachgewiesen werden (Lee et al., 2000; De Mota et al., 2000). Weitere Strukturen im Bereich des ZNS mit ausgeprägter Expression APJ-spezifischer mRNA waren der Vorder- und Zwischenlappen der Hypophyse, das Rückenmark und die *Medulla oblongata* (Hosoya et al., 2000; De Mota et al., 2000; Medhurst et al., 2003).

Auf Proteinebene wurde in der Peripherie über die stärkste Lokalisation des Rezeptors vor allem in Lunge, Herz und Leber sowie schwächere Expression in der Nierenrinde (Katugampola et al., 2001) und der Placenta (Cobellis et al., 2007) berichtet. Auf zellulärer Ebene konnte das Rezeptorprotein in Osteoblasten (Xie et al., 2006), Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten (Kleinz et al., 2005) nachgewiesen werden. Im ZNS wurde APJ Protein im zerebralen Cortex, den Basalganglien, in hippocampalen Formationen und verschiedenen subcorticalen Nuclei im Hypothalamus, Thalamus, Mittelgehirn und in der *Formatio reticularis* nachgewiesen werden (Medhurst et al., 2003). Dies war sowohl in neuronalen als auch glialen Zellen (Astrozyten) gleichermaßen gegeben. Darüber hinaus wurde auch über eine Lokalisation des Proteins in der Hypophyse berichtet (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2007). Trotz all dieser Untersuchungen fehlen jedoch

bis heute detailliertere Kartierungen der Verteilung des Rezeptorproteins vor allem im Bereich des Hypothalamus und Thalamus.

3. Apelin und Apelinformen

Das Apeligen des Menschen besitzt drei Exons bei einer Gesamtlänge von 1726 Basenpaaren, von welchen jedoch nur zwei codierend sind. Es ist sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte und der Maus auf dem X-Chromosom lokalisiert (Lee et al., 2000). Wie bereits zuvor erwähnt, wurde der Ligand des APJ-Rezeptors 1998 durch Tatemoto et al. (1998) entdeckt. Den Autoren gelang es, Apelin aus Extrakten des Rindermagens zu isolieren und als 36 Aminosäuren langes Peptid zu identifizieren. Die Definition als möglicher Ligand für APJ beruhte auf seiner Fähigkeit, in APJ-exprimierenden *Chinese hamster ovary* (CHO) Zellen die extrazelluläre Säureproduktion durch Aktivierung eines Na^+/H^+ -Austauscher Proteins zu erhöhen.



Abbildung 4: Alignment der Preproapelin Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies mit markierten Sequenzen für Apelin36, Apelin17 und Apelin13.

Das Alignment der 77 Aminosäuren langen Aminosäure-Sequenzen wurde erstellt mit dem NCBI Alignment-Tool Cobalt. GenBank und NCBI Reference Sequence accession numbers: AAF25815.1, NP_001177797, AAF25814.1, AAH20015, NP_776928, ACT76163, NP_001159596.

Synthetisiert wird das Peptid zunächst jedoch als Prepropeptid (Preproapelin) von 77 Aminosäuren Länge. Der Vergleich der Sequenzen dieser Vorläuferform zeigte bei Säugetieren eine hohe Übereinstimmung; so erweist sich die Sequenz von Mensch und Ratte zu 82 % als identisch (Lee et al., 2000) (Abbildung 4). In allen bisher beschriebenen

Säugetierspezies zeigten sich die letzten C-terminalen 23 Aminosäuren des Preproapelins, für alle untersuchten Spezies des Vertebratenreichs die letzten 12 Aminosäuren, als vollständig konserviert (Moon et al., 2007). Die native Form des Vorläuferproteins konnte in der Maus anhand von Western Blot Analysen exklusiv als über Disulfidbrücken verbundenes Dimer nachgewiesen werden (Lee et al., 2005). Anhand einiger basischer Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Preproapelins wurden *in silico* potentielle Peptidase-Schnittstellen ermittelt und man vermutete, dass das Vorläuferpeptid anhand dieser in die kürzeren, biologisch aktiven Peptide Apelin36 (AS 42-77), Apelin17 (AS 61-77) und Apelin13 (AS 65-77) fragmentiert wird (Habata et al., 1999).

Zusätzlich existiert mit dem [Pyr¹]Apelin13 (PyrAp13) eine mit einem Glutamatrest N-terminal posttranslational veränderte Form (Tatemoto et al., 2001) von der man vermutet, dass sie, wie auch bei anderen biologisch aktiven Peptiden, dem Schutz vor enzymatischem Abbau dienen soll (Kleinz et al., 2005). Alle eben beschriebenen Apelinfragmente zeigten durch zahlreiche spätere Untersuchungen eine hohe Rezeptoraffinität (und entsprechende biologische Aktivität). Ein noch kürzeres Fragment (Apelin10) hingegen demonstrierte nur eine niedrige Affinität für APJ und keine biologische Aktivität *in vitro* und *in vivo* (Reaux et al., 2001; El Messari et al., 2004).

Aufgrund des Auftretens mehrerer Apelinfragmente stellte sich die Frage nach deren biologischer Bedeutung sowie der jeweils aktiveren Form. Im Vergleich von Apelin13 und Apelin36 konnte an mit APJ-transfizierten HEK293-Zellen durch Apelin36 ein längerer Effekt beispielsweise auf die Internalisierung des Rezeptors als durch Apelin13 beobachtet werden: die durch Apelin13 verursachte Internalisierung dauerte mit 60 min wesentlich kürzer als die durch Apelin36 (> 2 Std.) (Zhou et al., 2003). Außerdem führte PyrAp13 nur zu einer transienten, Apelin36 hingegen zu einer längerfristigen Erhöhung der extrazellulären Säureproduktion, ebenfalls in APJ-transfizierten CHO-Zellen (Hosoya et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnten Tatemoto et al. (1998) jedoch zeigen, dass Apelin13 und Apelin17 im Vergleich zu Apelin36 wesentlich potenter die extrazelluläre Säureproduktion beeinflussten. Dabei korrelierte *in vivo* die Stärke des ausgelösten Effekts auf den mittleren arteriellen Blutdruck invers zur Peptidlänge (Tatemoto et al., 2001). In einer weiteren *in vivo* Studie konnte ebenfalls ein potenterer kardioprotektiver Effekt für Apelin13, verglichen mit Apelin36, ausgelöst werden (Simpkin et al., 2007). Aufgrund der höheren Potenz *in vivo* und der in Rezeptorbindungsstudien ermittelten höheren Affinität am Rezeptor (*Tabelle 1*) wurde

in den meisten bisher durchgeführten Studien Apelin13 oder PyrAp13, und nicht Apelin36 eingesetzt. Aufgrund des schon beschriebenen, vermuteten Schutzes vor Degradation wurde die pyroglutamylierte Form von Apelin13 dabei bevorzugt *in vivo* und *in vitro* verwendet.

Welche Enzyme für die Fragmentierung des Preproapelins verantwortlich sind, ist bis heute nahezu unbekannt. Eine erste Studie konnte *in vitro* Apelin13 und Apelin36 als Substrat für das Angiotensin-converting Enzym II (ACE2) bestätigen (Vickers et al., 2002). Als Monocarboxypeptidase spaltete das Enzym dabei von beiden Apelinformen jeweils nur das C-terminale Phenylalanin ab. Für Apelin13 geschah dies mit annähernd der gleichen Effizienz wie für AngII. Ob das Enzym auch für die Prozessierung *in vivo* verantwortlich ist, ist bis heute nicht bekannt.

Tabelle 1: Darstellung der durch Rezeptorbindungsstudien verschiedener Autoren ermittelten Rezeptoraffinitäten (pIC50) der unterschiedlichen Apeline (verändert aus (Pitkin et al., 2010))

Ligand	Affinität (pIC50)	Referenzen
Apelin36	8.6–8.3	Hosoya et al., 2000; Kawamata et al., 2001; Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003
Apelin17	9.0–7.9	Medhurst et al., 2003; El Messari et al., 2004
[Pyr ¹] Apelin13	8.9–8.0	Hosoya et al., 2000; Medhurst et al., 2003; El Messari et al., 2004
Apelin13	9.2–8.8	Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003

Preproapelin-spezifische mRNA zeigte in der Peripherie eine ähnlich verbreitete Verteilung wie die des Rezeptors APJ und konnte sowohl durch PCR als auch durch Northern Blot Analysen ebenfalls in einer Reihe von Geweben nachgewiesen werden. Dazu zählten in sehr hoher Konzentration bei der Ratte vor allem Lunge, Herz und Milchdrüse und in niedrigerer Konzentration Fettgewebe, Darm, Niere, Ovar, Hoden und *Vas deferens* (Habata et al., 1999; Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; Kawamata et al., 2001). Auch in der Hypophyse und im ZNS zeigte sich eine differenzierte Verteilung der Preproapelin-spezifischen mRNA mit starker Expression in Rückenmark, Hypophyse und *Nucleus accumbens*, sowie moderater Expression in Pinealorgan, *Tuberculum olfactorium*, Cortex, *Striatum*, Mittelhirn, *Hippocampus*, *Medulla*, *Pons*, *Septum*, *Amygdala*, *Substantia nigra* und *Corpus callosum* (Lee et al., 2000; Medhurst et al., 2003). Im Gegensatz dazu konnte im Hypothalamus keine ausgeprägte mRNA-Verteilung detektiert werden. Starke Markierungen ergaben sich in

diesem Teil des Gehirns nur in den magnozellulären Neuronen des PVN sowie SON (Lee et al., 2000).

Tabelle 2: Zusammenstellung zur vergleichenden Expression von APJ und Apelin auf Protein- bzw. Peptidebene in unterschiedlichen Geweben von Ratte, Maus und Mensch. Die Stärke der Expression ist mit +, ++ und +++, fehlende Information zur Expression mit - gekennzeichnet. (Aus Kleinz und Davenport, 2005)

	APJ			Apelin		
	Ratte	Maus	Mensch	Ratte	Maus	Mensch
Gehirn	++	+	+++	+	+++	++
Cerebellum	+		+	+		+
Hypophyse	+		+	+		++
Rückenmark	+++	++	+	++		++
Nebenniere	+			+		
Schilddrüse	++					
Milz	-	+	+++	-	+	
Herz	++	+++	+	++	++	+
Endothelzellen	++					
Lunge	+++	++	++	+++	++	+
Magen	+		+	+		-
Leber	+	+		-	-	-
Pankreas	-		+	-	-	-
Niere	+	+	+	+	+	+
Hoden	+	+	+	+	++	+
Ovar	+	+	+	+	+	
Uterus	+	+	+	+	-	-
Placenta	++	++				+++
Milchdrüse	+			++		
Skelettmuskel	++	++	+	+	+	-
Fettgewebe	++			+		
Knorpel	++					

Auf Proteinebene wurde für Apelin eine ähnliche Verteilung wie für die mRNA des Preproapelins beschrieben (Kawamata et al., 2001). Von verschiedenen Autoren wurde die Verteilung der unterschiedlichen Peptide im ZNS untersucht. Für Apelin36 wurde über Immunreaktivität (IR) in SON, PVN, SCN, *Zona interna* der *Eminentia mediana*, sowie Hinter- und Vorderlappen mit *Infundibulum* der Hypophyse berichtet (Brailoiu et al., 2002). Für Apelin17 demonstrierte eine ausführliche Kartierungsstudie im Gehirn der Ratte

immunreaktiv markierte Zellkörper in der Präoptischen Region, in SON und PVN, sowie im Bereich der *Pons* und der *Medulla oblongata*. Die stärkste immunreaktive Darstellung neuronaler Zellkörper fand im ARC statt (Reaux et al., 2002). Weiterhin konnten zahlreiche Apelin17-immunreaktive Nervenfasern in circumventrikulären Organen wie dem OVLT, dem SFO und der *Area Postrema* sowie zahlreichen anderen Arealen und Nuclei wie z.B. dem SCN detektiert werden.

Zusätzlich zu der Arbeit von Reaux et al. (2002) berichteten De Mota et al. (2004) über ausgeprägte Apelin17-immunreaktive Signale in der Hypophyse und im Pinealorgan, moderater Apelin17-IR im Hypothalamus und schwacher IR in Mittelhirn, *Medulla oblongata*, *Cerebellum*, *Striatum* und Cortex. Eine entsprechende Übersicht über die Detektion von Apelin und APJ in den unterschiedlichen Körpergeweben von Ratte, Maus und Mensch ist in *Tabelle 2* dargestellt.

Neben der genannten gewebespezifischen Expression von APJ und Apelinen wurde auch über die Sekretion des Peptids in Kolostralmilch beim Rind und eine Detektion in normaler Milch von Rind, Ratte und Mensch berichtet (Hosoya et al., 2000; Kawamata et al., 2001; Wang et al., 2004). Weitere Untersuchungen berichten über einen Plasma-Apelinspiegel im Blut von Ratte und Mensch (Chen et al., 2003; Foldes et al., 2003). Dabei handelt es sich zumindest in der Maus hauptsächlich um Apelin17 und Apelin13 (De Mota et al., 2004). Somit kann Apelin sowohl als Neurotransmitter, klassisches Hormon oder parakriner Faktor agieren.

4. Physiologische Funktionen des apelinergen Systems

Zahlreiche physiologische Funktionen sind bisher für das apelinerge System beschrieben. Den größten Anteil haben dabei Wirkungen auf das kardiovaskuläre System, gefolgt von solchen auf Energie-, Wasser-, Elektrolyt- und Temperaturhomöostase. Auch eine Beeinflussung der HPA-Achse konnte gezeigt werden.

4.1 Apelin/APJ und die Homöostase des kardiovaskulären Systems

Aufgrund der ausgeprägten Expression sowohl von Apelin als auch APJ im Herzen und in Endothelzellen (Apelin) bzw. glatten Muskelzellen (APJ) vieler Blutgefäße wurde schon früh

eine Regulation kardiovaskulärer Parameter durch das apelinerge System diskutiert (Lee et al., 2000). Zahlreiche Veröffentlichungen zu Apelin beschäftigten sich folgerichtig mit seinem kardiovaskulären Wirkungsspektrum. So gehört Apelin zu den potentesten bisher bekannten (endogenen), positiv inotropen Substanzen für das Myokard (Szokodi et al., 2002). Die Kontraktilität des Rattenherzens, von Herzgewebestücken der Ratte und des Menschen sowie von isolierten Kardiomyozyten konnte *in vitro* durch die Stimulation mit unterschiedlichen Apelinpeptiden maßgeblich gesteigert werden (Szokodi et al., 2002; Dai et al., 2006; Farkasfalvi et al., 2007; Maguire et al., 2009). Pathophysiologisch kommt es durch kardiologische Fehlfunktionen wie Herzversagen oder Insuffizienz des Myokards zu einem kurzfristigen Anstieg des Apelinplasmaspiegels und bei Patienten mit linksventrikulären Unterstützungssystem zur Aufrechterhaltung kardialer Funktionalität ebenfalls zu einer Hochregulation des APJ-Rezeptors (Chen et al., 2003). Beide Befunde werden mit der unterstützenden Rekrutierung des apelinergen Systems und anderer inotroper Systeme als kompensatorischem Mechanismus durch das versagende Herz erklärt (Chen et al., 2003). Ist das Herzversagen durch eine Ischämie hervorgerufen, so sind sowohl Apelin als auch APJ im Herzmuskel der Ratte hochreguliert (Atluri et al., 2007; Sheikh et al., 2008). Durch die Gabe von Apelin konnten die Tiere weiterhin vor einem nach der Ischämie möglichen Reperfusionsschaden geschützt werden (Simpkin et al., 2007; Zeng et al., 2009).

Auf vaskulärer Ebene wurde schon früh über einen hypotonen Effekt der drei Apelinpeptide berichtet. So konnte der arterielle Blutdruck von anästhesierten und wachen Ratten durch periphere, intravenöse Verabreichung von Apelin erniedrigt werden (Lee et al., 2000; Tatemoto et al., 2001; El Messari S. et al., 2004). Diese Wirkung konnte für Maus, Schaf und Mensch bestätigt werden (Ishida et al., 2004; Charles et al., 2006; Japp et al., 2008). Der Vergleich der Wirkung von zentraler und peripherer Apelin₁₃ Verabreichung auf den mittleren arteriellen Blutdruck zeigte dagegen keinen Effekt bei zentraler, intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Applikation (Reaux et al., 2001). In Bezug auf die Vermittlung des vasodilatierenden Effekts der Apelinpeptide deuten zahlreiche Publikationen auf eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) hin, da die Wirkung durch entsprechende Inhibitoren der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (*siehe Kap. 8*) aufgehoben werden konnte (Tatemoto et al., 2001; Ishida et al., 2004; Jia et al., 2007; Japp et al., 2008).

In einer Studie zu den Wirkungen des apelinergen Systems auf Gefäßgewebe waren APJ-spezifische knockout (k.o.) Mäuse vor der Entwicklung einer durch oxidativen, stressbedingten Arteriosklerose geschützt (Hashimoto et al., 2007). Zusätzlich dazu zeigten

viele APJ k.o. Mäuse kardiovaskuläre Entwicklungsstörungen (Charo et al., 2009) wie z.B. eine verzögerte retinalvaskuläre Entwicklung (Kasai et al., 2008) sowie eine Beeinträchtigung der Kontraktionsfähigkeit des Herzens im Zusammenhang mit Alter und Überdruckbelastung (Kuba et al., 2007). Isolierte Kardiomyozyten sowohl der APJ als auch der Apelin k.o. Tiere zeigten bei ihrer Kontraktion eine weniger ausgeprägte Sarkomerverkürzung und eine Beeinträchtigung der Kontraktions- und Relaxionsgeschwindigkeit (Charo et al., 2009), was zusätzlich die Wichtigkeit des apelinergen Systems in Bezug auf kardiovaskuläre Parameter hervorhebt.

4.2 Apelin/APJ und die Regulation des Energiehaushaltes

Bereits kurz nach der Entdeckung und Charakterisierung des Apelins konnte seine Expression im weißen Fettgewebe der Ratte nachgewiesen werden. (Kawamata et al., 2001; Tatemoto et al., 2001; Medhurst et al., 2003). Weiterhin wurde ausgeprägte Apelin-Immunreaktivität in den hypothalamischen Kerngebieten PVN, *Nucleus ventromedialis* (VMH), *Nucleus dorsomedialis* (DMH) und ARC, welche für ihre Involvierung in der Regulation der Nahrungsaufnahme bekannt sind, detektiert (Reaux et al., 2002). Eine spätere Studie wies Adipozyten der Maus und des Menschen selbst als Quelle des sezernierten Apelins aus und konnte zusätzlich eine Abhängigkeit der Expression Apelin-spezifischer mRNA vom Ernährungsstatus zeigen (Boucher et al., 2005). So zeigte sich diese durch Hungern stark reduziert, erreichte aber durch Füttern der Tiere wieder ein der Situation ohne Futterrestriktion vergleichbares Niveau. Weiterhin konnte in der gleichen Studie gezeigt werden, dass Insulin einen direkten positiven Einfluss auf die Produktion von Apelin in Adipozyten *in vitro* und *in vivo* ausübt. Eine andere Studie zeigte hingegen ebenfalls *in vitro* und *in vivo* die Inhibierung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch Apelin36 bei normalen Mäusen sowie insulinrestistenten Futter-induziert fettleibigen Mäusen (Sorhede et al., 2005). Zusätzlich stimulierte die intravenöse Applikation von Apelin die Glucoseaufnahme und konnte sogar die Glucosetoleranz in fettleibigen und insulinresistenten Mäusen wiederherstellen (Dray et al., 2008). Beim Menschen konnte eine positive Korrelation zwischen *body mass index* und dem Plasmaspiegel von Apelin festgestellt werden (Heinonen et al., 2005). Weiterhin zeigten Patienten mit noch nicht behandeltem Typ2 *Diabetes mellitus* einen erniedrigten und Kinder mit Typ1 *Diabetes* einen erhöhten Apelin-

Plasmaspiegel (Erdem et al., 2008; Meral et al., 2010). All diese Befunde zeigen eine klare Beteiligung des apelinergen Systems an der Regulation des Energiehaushaltes.

4.3 Apelin/APJ und die HPA-Stressachse

Für das apelinerge System wurde schon früh unter anderem aufgrund seiner Expression in den parvozellulären Neuronen des PVN eine mögliche Co-Expression mit CRF vorgeschlagen (O'Carroll et al., 2000). Eine Aktivierung der HPA-Achse konnte schließlich anhand zentraler i.c.v. Injektionen von Apelin13 bei der Ratte gezeigt werden, welche den ACTH- und Corticosteron-Plasmaspiegel erhöhten (Taheri et al., 2002). In der gleichen Studie erhöhte die Stimulation mit Apelin13 ebenfalls die Freisetzung von CRF und AVP aus hypothalamischen Explantaten. Im Hypophysenvorderlappen (HVL) wiederum konnte eine hohe Expression von APJ-spezifischer mRNA und Apelin, und schließlich eine direkte Einflussnahme durch Apelin17 auf die Freisetzung von ACTH aus einem *ex vivo*-System des HVLs gezeigt werden (Reaux-Le Goazigo et al., 2007). Apelin führte somit zu einer direkten Aktivierung der HPA-Achse sowohl auf hypothalamischer als auch adenohipophysärer Ebene. Weiterhin wurde eine Stimulation der Expression APJ-spezifischer mRNA im PVN durch Stressstimuli bei normalen, nicht jedoch bei adrenaletomierten Ratten beschrieben (O'Carroll et al., 2003).

4.4 Apelin/APJ und die Temperaturregulation

Die bis dato vorhandenen Hinweise auf eine apelinerge Bedeutung für die Thermoregulation sind marginal und noch dazu widersprüchlich. Darüber hinaus wurde die Körpertemperatur meist nur als Begleit- und nicht als Zielparamater betrachtet. In einigen wenigen Studien konnte durch einmalige bzw. chronische zentrale Applikation (i.c.v.) von Apelin13 ein geringfügiger Anstieg der Körpertemperatur bei Ratten und Mäusen registriert werden (Jaszberenyi et al., 2004; Higuchi et al., 2007; Valle et al., 2008). Valle et al. (2008) zeigten jedoch, dass bei chronischer i.c.v. Mikroapplikation von Apelin13 bei der Maus der Anstieg der Körpertemperatur durch eine erhöhte lokomotorische Aktivität bedingt war. Neben diesem offensichtlich noch unklaren Einfluss von zentralem Apelin auf die Körpertemperatur konnte durch die chronische intraperitoneale (i.p.) Verabreichung von Apelin13 die mRNA-

und Protein-Expression des *uncoupling protein 1* (UCP1) im braunen Fettgewebe (BAT) von adulten Mäusen erhöht werden (Higuchi et al., 2007). UCP1 spielt durch die Entkopplung der Atemkette eine essenzielle Rolle bei der zitterfreien Thermogenese im braunen Fettgewebe (Klingenspor, 2003). Die Unterbindung der durch zentral Apelin13-induzierten Hyperthermie durch pharmakologische Hemmung der Cyclooxygenase erbrachte erste Hinweise auf eine Rolle von Apelin bei der Fieberreaktion (Jaszberenyi et al., 2004). Weitere Untersuchungen zu dieser Thematik lagen jedoch bis *dato* nicht vor.

4.5 Apelin/APJ und die Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes

Wie schon eingangs erwähnt, spielt das in den magnozellulären Neuronen des PVN und SON gebildete Vasopressin eine essentielle Rolle in der Regulation des Salz- und Wasserhaushalts (Brownstein et al., 1980; Antunes-Rodrigues et al., 2004). Apelin und APJ werden im PVN und SON exprimiert (O'Carroll et al., 2000; De Mota et al., 2000; Reaux et al., 2001; Brailoiu et al., 2002; Reaux et al., 2002) und osmotische Stimuli wie der Entzug des Trinkwassers führten zu einer erhöhten Expression von Apelin und APJ-spezifischer mRNA im PVN und SON (O'Carroll et al., 2003; Reaux-Le Goazigo A. et al., 2004). Außerdem konnte durch i.c.v. Applikation von PyrAp13 ein verminderter Vasopressinplasmaspiegel bei Mäusen (Reaux et al., 2001), und an SON-Explantaten der Ratte durch Apelin13 eine direkte Inhibition der Vasopressinfreisetzung beobachtet werden (Tobin et al., 2008). Auch beim Menschen konnte ein direkter reziproker Zusammenhang zwischen Vasopressin- und Apelinplasmaspiegel bei osmotischen Reizen festgestellt werden (Azizi et al., 2008). In Bezug auf eine modulatorische Rolle von Apelin auf die Trinkwasseraufnahme nach i.c.v. Applikation existieren jedoch kontroverse Daten. So wird hierfür sowohl über eine Steigerung (Taheri et al., 2002), eine Reduktion (Reaux et al., 2001; Clarke et al., 2009) als auch vollständige Wirkungslosigkeit (O'Shea et al., 2003; Mitra et al., 2006) berichtet.

Eine komplizierte Studie an APJ k.o. Mäusen unterstreicht die essentielle Rolle des apelinergen Systems bei der Regulation der Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes. So tranken diese Mäuse bei freiem Zugang zu Wasser, bei gleicher Urinmenge und Plasmaosmolalität wie bei Wildtyptieren, signifikant weniger (Roberts et al., 2009). Bei 24-stündigem Trinkwasserentzug zeigten die gleichen Tiere, ganz im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen, keine Reduktion ihres Urinvolumens und keine Erhöhung der Plasmaosmolalität.

5. Apelinerge, intrazelluläre Signaltransduktion

Zahlreiche Studien haben sich bisher mit möglichen intrazellulären Signalwegen des apelinergen Systems befasst, wobei ein großer Teil dieser Experimente an mit APJ transfizierten Zelllinien oder Primärkulturen aus peripheren Geweben durchgeführt wurde. Ein erster Hinweis auf die mögliche Kopplung an die Aktivität der Adenylylcyclasen konnte anhand der inhibitorischen Wirkung aller Apelinpeptide (PyrAp13, Apelin13, Apelin17 und Apelin36) auf die Forskolin-induzierte Produktion von cAMP in CHO-Zellen gewonnen werden (Habata et al., 1999; De Mota et al., 2000). Aufgrund dieser Inhibierung wurde eine Kopplung des Rezeptors durch inhibitorische G-Proteine (G_i) postuliert und konnte anhand der Suppression des Effekts durch Pertussis-Toxin (Ptx) bestätigt werden (Hosoya et al., 2000; Masri et al., 2002). Dabei erwiesen sich die letzten vier (De Mota et al., 2000) bzw. fünf N-terminalen und die letzten zwei C-terminalen Aminosäuren (El Messari et al., 2004) von Apelin17 (K17F) als nicht essentiell. Im Gegensatz dazu wurde jedoch für die inotrope Wirkung von Apelin auf die kardiale Kontraktilität bei Ratten auch die Beteiligung eines Ptx-insensitiven G-Proteins (G_q) mit der Involvierung des PLC-PKC-Signalwegs vorgeschlagen (Szokodi et al., 2002).

Weiter „downstream“ im apelinergen Signalweg wurde schließlich über die Involvierung des Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K)/Akt-Signalwegs und die Aktivierung durch Phosphorylierung von MAP-Kinasen wie vor allem der *extracellular regulated kinase* 1/2 (ERK 1/2) in APJ-transfizierten Zellen und Zellen mit nativer APJ-Expression berichtet (Masri et al., 2002; 2004; Xie et al., 2006; Bai et al., 2008). Für entsprechende Signalkaskaden in neuronalen oder glialen Zellen des ZNS konnte eine Aktivierung von ERK1/2 bisher nur in einer Publikation an primär kultivierten Neuronen des Hippocampus gezeigt werden (O'Donnell et al., 2007).

Calcium spielt eine essentielle Rolle im ZNS und speziell bei der Signalübertragung am synaptischen Spalt. So induziert der Calciumeinstrom durch spannungsgesteuerte Kanäle die Freisetzung von Neurotransmittern aus speziellen Vesikeln der präsynaptischen Terminalen eines Neurons (Wheeler et al., 1994; Review: Sudhof, 2011). Weiterhin können Neurotransmitter auf der postsynaptischen Seite selbst über die Aktivierung von rezeptorgesteuerten Kanälen einen Calciumeinstrom induzieren (Yuste und Katz, 1991). Darüber hinaus spielt Ca^{2+} als *second messenger* eine wichtige Rolle in Neuronen und Astrozyten. So exprimieren sowohl Gliazellen als auch Neurone eine große Zahl an GPCRs, welche unter anderem mit

intrazellulären Calcium-Signalkaskaden in Verbindung stehen (Porter und McCarthy, 1997). Sie können sowohl von Neurotransmittern des präsynaptischen Terminals (Porter und McCarthy, 1996; Kang et al., 1998; Perea und Araque, 2005) als auch von sogenannten Gliotransmittern (Bezzi et al., 1998; Pascual et al., 2005; Navarrete und Araque, 2008) aktiviert werden und spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der glial-neuronalen und glial-glialen Kommunikation. Eine Erhöhung des intrazellulären Calciumgehaltes nach apelinergem Stimulation konnte bisher unter anderem in APJ-transfizierten Zellen (Medhurst et al., 2003; Fan et al., 2003), isolierten Kardiomyozyten (Wang et al., 2008), aber auch in einer menschlichen neuronalen Zelllinie (Choe et al., 2000) und als erste vorläufige Studie vor allem an hypothalamischen magnozellulären Neuronen der Ratte (Tobin et al., 2008) gezeigt werden. Bei all diesen Untersuchungen handelte es sich jedoch um vorläufige Daten; eine möglicherweise aplinerge Modulation eines klassischen Neurotransmitters konnte hingegen bisher nicht gezeigt werden.

Unabhängig von der Funktion der G-Proteine wurde, wie bereits erwähnt, in der Sequenz des APJ-Rezeptors eine Internalisierungssequenz identifiziert und eine entsprechende Internalisierung durch Apelin13 und Apelin36 an transfizierten CHO-Zellen beschrieben (Reaux et al., 2001; Zhou et al., 2003). Somit besteht die Möglichkeit der Aktivierung zusätzlicher G-Protein-unabhängiger Signalwege durch die Internalisierung des Rezeptors.

6. Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und NOS-Isoformen

Stickstoffmonoxid (NO) wurde 1980 als *endothelium-derived relaxing factor* entdeckt (Furchgott und Zawadzki, 1980). Bis heute wurden über 110 000 biomedizinische Fachpublikationen mit alleine fast 15 000 Reviews über NO veröffentlicht. NO spielt als gasförmiges Signalmolekül mit sehr kurzer biologischer Halbwertszeit eine essentielle Rolle bei der parakrinen Regulation zahlreicher physiologischer Funktionen und folglich auch pathophysiologischer Veränderungen wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Schlaganfall, *Diabetes* und Krebs (siehe Review: Hirst und Robson, 2011). Seine Entstehung wird durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) aus L-Arginin, NADPH+H⁺ und Sauerstoff zu NO, Citrullin und ½NADPH katalysiert (Palmer et al., 1988; Schmidt et al., 1988) (*Abbildung 5*). Strukturell liegt die aktive Form des NOS-Enzyms als Tetramer mit zwei NOS-Monomeren und zwei assoziierten Calmodulinmolekülen vor (Alderton et al., 2001).

Von NOS wurden bisher mit neuronaler (nNOS), endothelialer (eNOS) und induzierbarer (iNOS) drei Isoformen identifiziert. Diese wurden früher ursprünglich aufgrund des Ortes ihrer Expression und ihrer Funktionalität als die konstitutiv exprimierten Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Formen (nNOS und eNOS) bzw. induzierbare und entsprechend Ca^{2+} -unabhängige Form (iNOS) charakterisiert (Steinert et al., 2010).

Die nNOS wurde erstmalig für das Gehirn beschrieben (Bredt et al., 1990), ist jedoch auch im peripheren Nervensystem und im Skelettmuskel exprimiert und wird im ZNS unter anderem mit Verhalten wie Lernen und Gedächtnisbildung, Nahrungsaufnahme, Schlaf und männlichem/weiblichem Reproduktionsverhalten assoziiert (Garthwaite, 2008). Von dieser Isoform wurden bisher neben der Version mit voller Länge (nNOS- α) vier verschiedene Splicevarianten (β , γ , μ und NOS-2) (Abbildung 6) detektiert. Von diesen Formen stellt jedoch die α -Form die bei weitem dominanteste Form dar (Steinert et al., 2010).

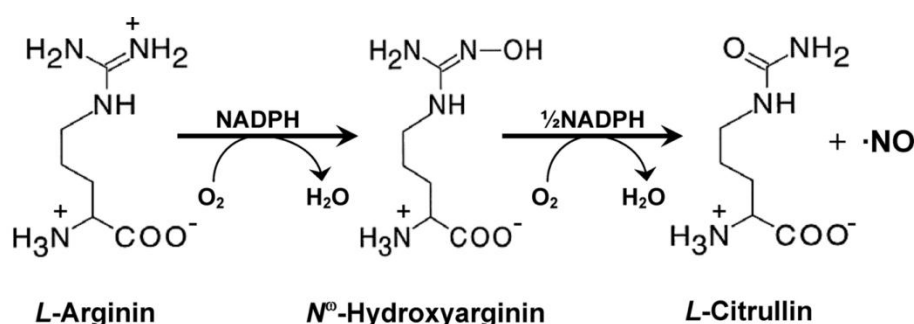


Abbildung 5: Biosyntheseweg von Stickstoffmonoxid (NO) durch das Enzym NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin.

Zur Synthese von NO wird L-Arginin in einer zweistufigen Reaktion über das Intermediat N^ω-Hydroxyarginin zu L-Citrullin anhand von Co-Faktoren wie Flavinen und Tetrahydrobiopterin oxidiert. Weiterhin sind Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und O₂ für die Produktion von NO essentiell (Aus Manukhina et al., 2006).

Zentrales NO beeinflusst unter anderem mit dem kardiovaskulären System, dem Energiehaushalt, der HPA-Achse, dem Salz-/ Wasserhaushalt und der Körpertemperatur-regulation physiologische Funktionen (Gerstberger, 1999; Kadekaro und Summy-Long, 2000; Nelson, 2005; Currie et al., 2011), für die ebenfalls eine apelinerge Involvierung beschrieben wurde. Dabei konnte für das apelinerge System bereits eine Vermittlung vor allem vaskulärer Effekte in der Peripherie durch eNOS-induzierte Generierung von NO in Endothelzellen der Blutgefäße gezeigt werden. So konnte unter anderem der Subtyp-unspezifische NOS-Inhibitor

L-NAME eine durch die intravenöse Applikation von Apelin12 induzierte Absenkung des mittleren arteriellen Blutdrucks aufgrund vaskulärer Vasodilatation bei Ratten verhindern (Tatemoto et al., 2001). Weiterhin konnte eine Stimulation des L-Arginin-Transports und eine Potenzierung der eNOS-Aktivität durch Apelin36 in der isolierten Aorta der Ratte gezeigt werden (Jia et al., 2007). Auch beim Menschen führte die Applikation von PyrAp13 zu einer NO-abhängigen arteriellen Vasodilatation (Japp et al., 2008).

Im Gehirn konnten ebenfalls erste Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem apelinergen System und NO gezeigt werden. So führte die Mikroinjektion von L-Arginin in den *Nucleus caudatus* zu einer erhöhten, und die des NOS-Inhibitors L-NAME zu einer erniedrigten mRNA-Expression von nNOS und APJ (Bai et al., 2007). Weiterhin konnte L-NAME das durch i.c.v. Applikation von Apelin13 induzierte exploratives Verhalten abschwächen (Jaszberenyi et al., 2004). Zusätzlich konnte in einer aktuellen Publikation für die apelinerge Kontrolle der Glucosehomöostase ebenfalls eine Abhängigkeit von NO gezeigt werden (Duparc et al., 2011).

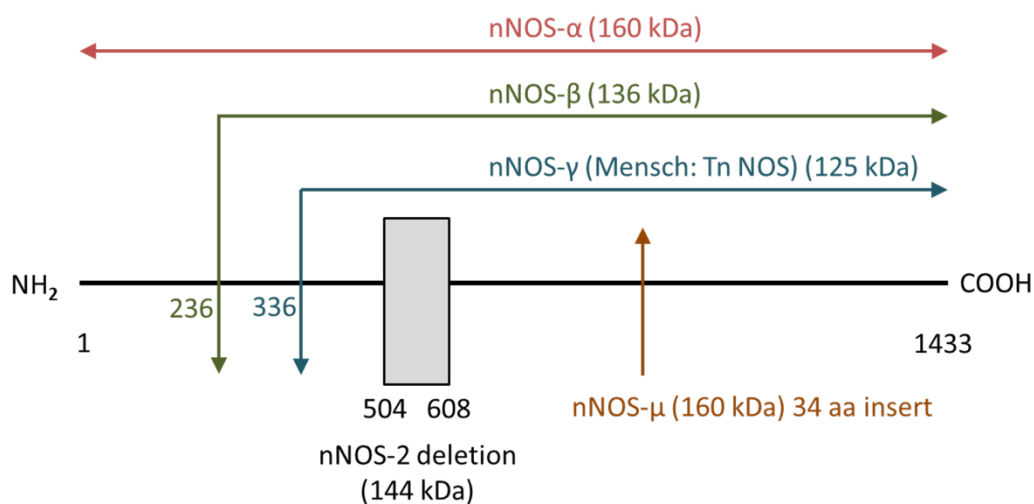


Abbildung 6: Darstellung der unterschiedlichen Splicevarianten der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) der Ratte.

Die nNOS-Varianten nNOS-α (Aminosäuren (AS) 1-1433; rot), nNOS-β (AS 236-1433; grün), nNOS-γ (AS 336-1433; blau) und nNOS-μ (AS 1-1433; orange) mit einem 34 Aminosäuren aa insert sind als Pfeile dargestellt. Die Deletion der AS 504-608 in der nNOS-2-Sequenz (AS 504-608) ist durch eine graue Box gekennzeichnet. (Verändert nach Alderton et al., 2001)

7. Fragestellungen der wissenschaftlichen Arbeit

Zahlreiche Untersuchungen der letzten zehn Jahren weisen auf eine bedeutende, teilweise noch umstrittene Funktion des apelinergen Systems im Rahmen der hypothalamischen Kontrolle mehrerer autonomer Körperfunktionen hin. Die bisher in wissenschaftlichen Veröffentlichungen beschriebene Expression des APJ-Rezeptors im ZNS beschränkt sich jedoch - im Gegensatz zur der der Apelinpeptide - hauptsächlich auf nur wenige Kerngebiete des Hypothalamus. Weiterhin bezieht sich ein Großteil dieser Studien nur auf den Nachweis der Rezeptor-spezifischen mRNA. Detaillierte Expressionsstudien des APJ-Proteins in den Bereichen des vorderen *Telencephalons*, limbischer Strukturen, des Thalamus und vor allem weiterer hypothalamischer Nuclei liegen bisher nur eingeschränkt vor. Deshalb war es ein wichtiges Ziel der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit, eine detaillierte APJ-spezifische semiquantitative Kartierung der Proteinexpression in hypothalamischen und extrahypothalamischen Kerngebieten des Gehirns der Ratte anhand von immunhistochemischen Methoden zu erstellen.

Stickstoffmonoxid (NO), produziert unter anderem von der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS), spielt ebenfalls eine essentielle Rolle bei der hypothalamischen Steuerung zahlreicher physiologischer Funktionen. Dabei konnte für das apelinerge System eine mögliche Interaktion mit NO in der Peripherie sowie im ZNS erst im Ansatz nachgewiesen werden. Deshalb war es ein weiteres Ziel der wissenschaftlichen Arbeit, in Kerngebieten mit ausgeprägter Expression des APJ-Rezeptors in immunpositiven Nervenfasern eine Co-Distribution zu erfassen und in Strukturen mit APJ-immunpositiven Perikaryen die quantitative Analyse einer direkten Co-Expression jeweils mit nNOS durchzuführen.

Intrazelluläres Calcium spielt in Neuronen und Gliazellen sowohl als *second messenger* als auch als Mediator zur Freisetzung von Neuro- und Gliatransmittern eine essentielle Rolle. Auch für das apelinerge System konnte in einigen wenigen Zellsystemen bereits eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) nach apelinenger Stimulation in APJ-transfizierten und neuronalen Zellen gezeigt werden. Ein weiteres wichtiges Ziel der wissenschaftlichen Arbeit war es deshalb, die Modulation der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen und Gliazellen nach apelinenger Stimulation bzw. die apelinerge Modulation der induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch einen klassischen Neurotransmitter wie Glutamat zu studieren. Dies sollte mittels Calcium-Imaging in spezifischen neuroglialen Primärkulturen des PVN

und MnPO als wichtigen regulatorischen Kerngebieten des Hypothalamus sowohl mit markanter APJ- als auch nNOS-Expression untersucht werden. Um Rückschlüsse auf eine mögliche Interaktion von NO und dem apelinergen System in diesen Kerngebieten ziehen zu können, wurden die untersuchten Zellen nach Abschluss der Messungen auf einen nitrergen Phänotyp hin untersucht.

In einigen wissenschaftlichen Publikationen wurde bisher über die Involvierung der MAP-Kinasen *extracellular regulated kinase* 1/2 (ERK1/2) im apelinergen Signalweg berichtet. Dies geschah hauptsächlich anhand der Untersuchung in diversen transfizierten und peripheren Zellkulturen. Deshalb war es ein weiteres Ziel der wissenschaftlichen Arbeit, die Aktivierung der ERK1/2 durch Apelin an einer Primärkultur des Hypophysenzwischenslappens (HZL) als einer Kultur mit hoher nativer APJ-Expression mittels quantitativer Westernblot-Analyse zu untersuchen. Darüber hinaus war es von Interesse zu analysieren, welche neuroendokrinen Zellen des HZLs (immunpositiv für ACTH, PACAP38 oder nNOS) sich als APJ-exprimierend erwiesen.

Der letzte wichtige Aspekt der wissenschaftlichen Arbeit bildete die *in vivo* Analyse physiologischer Parameter nach zentraler i.c.v. Applikation von Apelin in der Ratte. Dazu wurden vor Beginn der Versuche Temperatursender und stereotaktische Mikrokanülen zur späteren Apelin-Mikroapplikation implantiert und anschließend telemetrische Messverfahren zur Aufzeichnung von Körpertemperatur, lokomotorischer Aktivität und Futter-/Wasseraufnahme angewandt. In den durchgeführten Versuchen sollte die Auswirkung von i.c.v. Apelin auf (1) durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) induziertes *sickness behavior* wie Fieber, Anorexie, Adipsie, Lethargie und die Produktion von Cytokinen anhand telemetrischer Verfahren und entsprechender Bioassays untersucht werden. Weiterhin sollten der Einfluss von i.c.v. Apelin auf (2) Angiotensin II-vermittelte Effekte wie Trinkwasseraufnahme und Induktion des neuronalen Aktivitätsmarkers und Transkriptionsfaktors Fos anhand von immunhistochemischen Analysen und (3) die tageszeitabhängige Beeinflussung der erwähnten telemetrischen Parameter evaluiert werden.

B. Material und Methoden

I. Material

1. Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Firma	Ort
Absaugpumpe	Minni A	Leybold-Heraeus	Hanau (D)
Autoklav	2540EL	Tuttnauer	Breda (NL)
Binokular	Stemi SV11	Zeiss	Jena (D)
Binokular mit Kamera	SM2-U	Nikon Deutschland	Düsseldorf (D)
Bohrer f. i.c.v. OPs		Elektrogeräte Messner	Dettenhausen (D)
Brutschrank	Nuaire™ USAutoflow	Nuaire	Plymouth (USA)
Cryomikrotom	Modell 1205	R.Jung	Heidelberg (D)
Cryostat	HM500 O	Microm /Thermo Scientific	Walldorf (D)
Differenzialwaage (Futter)	EK200i	A&D Weighing	San Jose (USA)
Differenzialwaage (Wasser)	EW3006	A&D Weighing	San Jose (USA)
Eismaschine	Icematic F120	CastelMAC SpA	Castelfranco Veneto (I)
Elektronische Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra Biosciences	Wallisellen (CH)
ELISA-Reader	Digiscan	Asys Hitech	Eugendorf (AU)
Feinwaage	AE50	Mettler-Toledo	Giessen (D)
Fluoreszenzmikroskop	BX50	Olympus Deutschland	Hamburg (D)
Futter-Trinkanlage	Dietscan Analyser	Accuscan Instruments	Columbus (USA)
Geldokumentationssystem	Molecular Imager	Bio-Rad Laboratories	München (D)
Guillotine		Werkstatt Kerckhoff-Institut	Bad Nauheim (D)
Heißluftsterilisator	ED115/E2	WTB	Tuttlingen (D)
Heizmatte	60 x 40 cm	Marmed	Cölbe (D)
Käfige für Klimakammer		Campuswerkstatt Veterinärmedizin	Giessen (D)
Kaltlichtschwanenhalslampe	Intralux 5000	Volpi AG	Schlieren (CH)
Kaltlichtschwanenhalslampe	KL 1500	Schott	Mainz (D)

Calcium-Imaging-System <i>bestehend aus:</i>		Diagnostic Instruments Visitron Systems	Puchheim (D)
Inverses Mikroskop	IMT-2	Olympus Deutschland	Hamburg (D)
Kamera	Visicam 12 Bit digital CCD-System	Visitron Systems	Puchheim (D)
Steuereinheit	Mac-5000	Visitron Systems	Puchheim (D)
Fluoreszenzlampe	BH2-RFL-T3	Olympus Deutschland	Hamburg (D)
Kondensor	IMT-NAC 2	Olympus Deutschland	Hamburg (D)
Filterrad		Ludl Electronic Products	New York (USA)
Teflon Zellkultur-Messkammer		Werkstatt Kerckhoff-Institut	Bad Nauheim (D)
Wechselspannungsstabilisator		Wandel & Goltermann	Reutlingen (D)

Schwingungsfreier Tisch Kompressor	WS-5 Silent 30	TMC MAGV	Peabody (USA) Rabenau-Londorf (D)
Klimakammer		Weiss Klimatechnik	Reiskirchen-Lindenstruth (D)
Konfokales Laserscanmikroskop	TCS SL	Leica	Wetzlar (D)
Kühlraum		Vissmann	Allendorf (D)
Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0R	Thermo Scientific	Dreieich (D)
Kühlzentrifuge	Universal K2S	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen (D)
Laborfeinwaage	AE163	Mettler-Toledo	Giessen (D)
Laborwaage	P1210 N	Mettler-Toledo	Giessen (D)
Laminar-Flow Arbeitsbank	Hera Safe	Thermo Scientific	Dreieich (D)
Magnetrührer	CombiMag RCH	IKA Labortechnik	Staufen (D)
Magnetrührer m. Heizplatte	RCT basic	IKA Labortechnik	Staufen (D)
Microflow Biological Safty Cabinet		Thermo Scientific	Dreieich (D)
Mikroskop	Dialux 22 EB	Leitz-Leica	Wetzlar (D)
Mikroskop	HM Lux3	Leitz-Leica	Wetzlar (D)
mit digitaler schwarz-weiß Kamera	Camedia 3.1.0.	Visitron Systems	Puchheim (D)
Perfusorpumpensystem		Werkstatt Kerckhoff-Institut	Bad Nauheim (D)
pH-Meter	pH537 microprozessor	WTW	Weilheim (D)
pH-Meter	765 Calimatic	Knick	Berlin (D)
Pipetten	2,100,200,1000 µl	Gilson	Middleton (USA)
Pipetten	2500,1000,500,10 µl	Eppendorf	Eppendorf (D)
Power Supply	Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories	München (D)
Receiverplatten	RTA-500	Mini Mitter	Bend (USA)
Reinstwassersystem	Milli-Q biocell	Milipore	Eschborn (D)
Schermaschine		Aesculap-B.Braun	Tuttlingen (D)
Schlauchpumpe	Minipuls3	Abimed Analysentechnik	Langenfeld (D)
Schüttler	VFZ	IKA Labortechnik	Staufen (D)
Schüttler	Roto Mix 50800	Barnstead-Thermolyne/ Thermo Scientific	Dubuque (USA)
Schüttler	3011	GFL	Burgwedel (D)
Schüttler f. 96-Well-Platten	Perfect Spin P	Peqlab	Darmstadt (D)
Sicherheits-Bunsenbrenner	Fireboy eco	Integra Biosciences	Wallisellen (CH)
Stereotakter	Model 900	Kopf Instruments	Tujunga (USA)
Telemetrie Körpertemperatur	Dataport 24	Mini Mitter	Bend (USA)
Telemetrie Sender	VM-FH TR-3000	Mini Mitter	Bend (USA)
Temperatur-/Aktivitätstransmitter	RA-1010	Mini Mitter	Bend (USA)
Tischzentrifuge	Force 7	Denver Instruments	Göttingen (D)
Ultraschallhomogenisator		Bandelin	Berlin (D)
Ultraschallwasserbad	Emmi 30	EMAG	Salach (D)
Vibrator	550752/M	TSE	Kronberg (D)
Videokamera	CCD Coulor Camera	Video Euroline	Siebenbach (D)
Vortexer	VF2	IKA Labortechnik	Staufen (D)
Vortexgerät	MS1 Minishaker	IKA Labortechnik	Staufen (D)
Waage	universal U500D	Sartorius	Göttingen (D)
Waage	PM 2500 Delta R.	Mettler-Toledo	Giessen (D)

Wärmeschränke	T5050 EK u. 5042	Heraeus	Hanau (D)
Wärmeblock	QBT2	VWR	Darmstadt (D)
Wärmeblock	dri-block DB2A	Techne-Bibby Scientific	Staffordshire (UK)
Wärmematte f. stereotakt. OP		Werkstatt Vet. Physiol. und -Biochemie	
Zellkultur Mikroskop	Flouvert FU	Leitz-Leica	Wetzlar (D)
Zellkultur-Wassermantel-Inkubator	Cellstar	Queve Systems	Columbia (USA)
Zentrifuge	Digifuge GL	Heraeus	Hanau (D)
Zentrifuge	Universal K2S	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen (D)

2. Chemikalien und Substanzen

Name	Firma	Ort
(±)-(E)-2 [(E)-Hydroxyimino]-6-Methoxy-4-Methyl-5-Nitro-3-Hexamid (NOR-1)	Sigma-Aldrich	München (D)
1,4-Dihydro-5-(2-Propoxyphenyl)-7H-1,2,3-Triazol(4,5-d)Pyrimidin-7-one (Zaprinast)	Sigma-Aldrich	München (D)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich	München (D)
2-(N,N-Diethylamino-)Diazenolat 2 oxid (DEA-NONOate)	Sigma-Aldrich	München (D)
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich	München (D)
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich	München (D)
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) Dihydrochlorid	Mo Bi Tec	Göttingen (D)
Actinomycin	Sigma-Aldrich	München (D)
Ammoniumperoxodisulfat (AMPS)	Serva	Heidelberg (D)
[Ile ⁵] Angiotensin II (Mensch, Ratte)	Sigma-Aldrich	München (D)
Apelin36 (Mensch)	Bachem Deutschland	Weil a. Rhein (D)
Avidin/Biotin blocking Kit	Vector Laboratories	Burlingame, CA, (USA)
B27	Gibco-Invitrogen	Darmstadt (D)
Benzonase Endonuklease	Sigma-Aldrich	München (D)
Bisacrylamid	AppliChem	Darmstadt (D)
Blockingpeptid f. APJ Antikörper (Neuromics)	EMC microcollections	Tübingen (D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	München (D)
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich	München (D)
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg (D)
Calciumchlorid	Merck	Darmstadt (D)
Carbogengas	Messer Griesheim	Neuried (D)
Citifluor	Citiflour LTD	London (UK)
Coomassie Blue	Serva	Heidelberg (D)
Chromalaun	Merck	Darmstadt (D)
D-Glucose	Sigma-Aldrich	München (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	München (D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck	Darmstadt (D)
Dispase I	Roche Deutschland	Grenzach-Wyhlen (D)
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	München (D)

Donkeyserum	Biozol	Eching (D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen	Darmstadt (D)
Earle's Buffer	Invitrogen	Darmstadt (D)
Einbettmedium für Immunhistochemie	Jung	Nussloch (D)
Eisessig	Merck	Darmstadt (D)
Entellan	Merck	Darmstadt (D)
Ethanol	Schmidt	Dillenburg (D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich	München (D)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA	Pasching (AUT)
Fluoromount	Serva	Heidelberg (D)
Fura-2 Acetomethyl(AM)ester (Fura-2AM)	Mo Bi Tec	Göttingen (D)
Gelatine	Serva	Heidelberg (D)
Gentamycin	Biochrom	Berlin (D)
Gey's Balanced Salt Solution (GBSS)	Sigma-Aldrich	München (D)
Glycerin	Sigma-Aldrich	München (D)
Glycerinphosphat	Sigma-Aldrich	München (D)
Glycin	Merck	Darmstadt (D)
Goatserum	Biozol	Eching (D)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom	Berlin (D)
Histoclear	Ward's Natural Science	Rochester, NY, (USA)
Hydromount	Merck	Darmstadt (D)
Interleukin-6 (IL-6) Qualitätskontrollen + Standards	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)	Potters Bar (UK)
Isopropanol	Sigma-Aldrich	München (D)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	Darmstadt (D)
Kresylviolett	Merck	Darmstadt (D)
Laemmli-Puffer	Biorad Laboratories	München (D)
L-Glutamat, Monosodiumsalz	Sigma-Aldrich	München (D)
L-Glutamin	Biochrom	Berlin (D)
Lipopolysaccharid (E.coli, Serotyp 0111:B4)	Sigma-Aldrich	München (D)
Luminol	Sigma-Aldrich	München (D)
Magermilchpulver	Biorad Laboratories	München (D)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck	Darmstadt (D)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	München (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	Darmstadt (D)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck	Darmstadt (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	Darmstadt (D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck	Darmstadt (D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich	München (D)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich	München (D)
Neurobasal A Medium (NBA)	Invitrogen	Darmstadt (D)
n-Hexan	Merck	Darmstadt (D)
Nonidet	AppliChem	Darmstadt (D)
Normal horse serum (NHS)	PAA	Pasching (AUT)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	Darmstadt (D)
Para-Hydroxycumarinsäure	Sigma-Aldrich	München (D)
Penicillin/Streptomycin	PAA	Pasching (AUT)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin (D)
Phosphataseinhibitor Cocktail (P2850)	Sigma-Aldrich	München (D)

Phosphataseinhibitor Cocktail (P5726)	Sigma-Aldrich	München (D)
Phosphate buffered saline (PBS) tablets	Sigma-Aldrich	München (D)
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich	München (D)
Poly-L-Lysin	Biochrom	Berlin (D)
Proteaseinhibitor Cocktail (P2714)	Sigma-Aldrich	München (D)
Proteaseinhibitor Cocktail (P8340)	Sigma-Aldrich	München (D)
[Pyr ¹] Apelin13 (Mensch, Ratte, Maus, Rind))	Bachem Deutschland	Weil a. Rhein (D)
RLT-Puffer	Quiagen	Hilden (D)
RNase-Zap	Invitrogen	Darmstadt (D)
Rothwell Park Memorial Institut (RMPI) Medium 1640	PAA	Pasching (AUT)
Saccharose	Merck	Darmstadt (D)
Salzsäure (HCl)	Merck	Darmstadt (D)
Substratkit f. Western Blot	Biorad Laboratories	München (D)
TBS-Puffer	Biorad Laboratories	München (D)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem	Darmstadt (D)
Tissue Tec Einbettmedium	Jung	Nussloch (D)
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) Qualitätskontrollen + Standards	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)	Potters Bar (UK)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich	München (D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich	München (D)
Tween 20	Sigma-Aldrich	München (D)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck	Darmstadt (D)
Xylol	Merck	Darmstadt (D)
Zahnzement	Stoelting Europe	Dublin (IRE)

3. Medikamente und OP-Bedarf

Name	Zweck	Firma	Ort
Anti-Sedan	Antagonisierung Narkose	Pfizer	Berlin (D)
Augengel Vidisic	Schutz vor Austrocknung b. OP	Bausch & Lomb	Berlin (D)
Braunol	Wunddesinfektion	B.Braun	Melsungen (D)
Cepetor	Narkose	cp-pharma	Burgdorf (D)
Chirurgisches Wundnahtmaterial resorbierbar/nicht resorbierbar	Wundverschluss	SMI	St.Vith (B)
Cutasept	Desinfektion	Bode	Hamburg (D)
Doxapram	Atemstimulanz	Albrecht	Aulendorf (D)
Einmalkanülen (steril)	Injektionen	B.Braun	Melsungen (D)
Einmalskalpelle (steril)	OP	B.Braun	Melsungen (D)
Heparin	Antikoagulation	Rathiofarm	Ulm (D)
Ketamin(hydrochlorid)	Narkose	Bela pharm	Vechta (D)
Metacam	Analgesie	Boehringer	Ingelheim (D)
Narcoren	Euthanasie	Merial	Halbermoos (D)
Operationsbesteck	OP	Aesculap	Tuttlingen (D)
Vetranquil	Narkose	Albrecht	Aulendorf (D)

Xylazin	Narkose	cp-pharma	Burgdorf (D)
---------	---------	-----------	--------------

4. Antikörper

4.1 Primärantikörper

Antigen (Spezies)	Host	Firma	Ort	Verdünnung
ACTH (ACTH 1-24)	rabbit	<i>Gabe von Dr. Blähser, (Universität Giessen)</i>		1:2000
Apelin12 (Mensch, Rind, Ratte, Maus)	rabbit	Phoenix Pharma- ceuticals Europe	Karlsruhe (D)	1:500
Apelin17 (Mensch, Rind, Ratte, Maus)	rabbit	Bachem-Peninsula	Weil am Rhein (D)	1:500
Apelin77 (Maus)	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)	1:500
APJ-R (Ratte)	rabbit	Neuromics	Edina (USA)	1:1000
APJ-G (Mensch)	goat	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)	1:500
FOS (Mensch)	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)	1:1000
cGMP	sheep	<i>Gabe von Dr. deVente (Universität Maastricht)</i>		1:3000
CNPase (Mensch)	mouse	Sigma-Aldrich	München (D)	1:600
CRF (Mensch, Ratte, Maus)	rabbit	Bachem-Peninsula Laboratories	Weil am Rhein (D)	1:1000
ED1 (CD68) (Ratte)	mouse	AbD Serotec	Düsseldorf (D)	1:1000
GFAP	mouse	Chemikon-Millipore	Schwalbach (D)	1:800
GFAP (Rind)	rabbit	DAKO	Hamburg (D)	1:800
MAP (2a+2b)	mouse	Sigma-Aldrich	München (D)	1:600
nNOS (Ratte)	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)	1:1000
nNOS (Mensch)	mouse	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)	1:1000
NPY (Mensch, Ratte, Maus)	rabbit	Bachem-Peninsula Laboratories	Weil am Rhein (D)	1:1000
PACAP38 (Schaf)	rabbit	Bachem-Peninsula Laboratories	Weil am Rhein (D)	1:1000
β-Actin	rabbit	Sigma-Aldrich	München (D)	1:2000

4.2 Sekundärantikörper

Name	Host	Firma	Ort	Verdünnung
Cy3 anti-rabbit IgG (H+L)	donkey	Dianova	Hamburg (D)	1:1000
Cy3 anti-mouse IgG (H+L)	donkey	Dianova	Hamburg (D)	1:1000
Cy3 anti-mouse IgG (H+L)	goat	Dianova	Hamburg (D)	1:1000
Cy3 anti-sheep IgG (H+L)	donkey	Dianova	Hamburg (D)	1:1000
Cy3 anti-goat IgG (H+L)	donkey	Dianova	Hamburg (D)	1:1000
Cy3 gekoppeltes Streptavidin	donkey	Jackson Labs	Suffolk (UK)	1:1000
Alexa 488 anti-mouse IgG (H+L)	donkey	MoBiTec	Göttingen (D)	1:500
Alexa 488 anti-goat IgG (H+L)	donkey	MoBiTec	Göttingen (D)	1:500
Alexa 488 anti-rabbit IgG (H+L)	donkey	MoBiTec	Göttingen (D)	1:500
Alexa 488 anti-mouse IgG (H+L)	goat	MoBiTec	Göttingen (D)	1:500
Alexa 488 anti-mouse IgG (H+L)	donkey	MoBiTec	Göttingen (D)	1:500
Biotin anti-rabbit IgG	donkey	Jackson Labs	Suffolk (UK)	1:200
HRP anti-rabbit IgG	donkey	Biorad Laboratories	München (D)	1:2000

5. Ge- und Verbrauchsmaterial

5.1 Tierhaltung

Name	Firma	Ort
Standard-Rattenfutter (R-Z V1324-000)	ssniff	Soest (D)
Einstreu (SS14- H1505-219)	ssniff	Soest (D)
Polycarbonatkäfige Typ IV	Ehret Labor- und Pharmatechnik	Emmerdingen (D)
Polycarbonatkäfige Typ III	Ehret Labor- und Pharmatechnik	Emmerdingen (D)

5.2 Immunhistochemie und –cytochemie

12-Well-Platten	Greiner Bio One	Rainbach (D)
Objektträger	MAGV	Rabenau (D)
Deckgläschen 24 x 60 mm	Roth	Karlsruhe (D)
Einmalpasteurpipetten	MAGV	Rabenau (D)
Glasschalen (free floating)	MAGV	Rabenau (D)
Siebeinsätze für 12-Well-Platte	Corning	Corning (USA)
Inkubationsschienen Antikörperinkubation	Werkstatt Kerckhoff-Institut	Bad Nauheim (D)
Marderhaarpinsel	Renensis	Flensburg (D)

5.3 Zellkultur und Calcium-Imaging

CELLocate ®	Eppendorf	Hamburg (D)
Deckgläschen (15 x 15) Stärke 1	Menzel	Braunschweig (D)
Einmalskalpellklingen	Servoprax	Wesel (D)
Einwegspritzen 10 ml	B.Braun	Melsungen (D)
Falconröhrchen 15, 50 ml	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Filterpapier Ø 10 cm	Macherey-Nagel	Düren (D)
flexiPERM® Mikro-12 Kammerwände	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)
fusselfreie Tücher	Kimberley-Clark	Mainz (D)
Gewebekleber Histoacryl	B.Braun	Melsungen (D)
Gewebekleber Vetglue	B.Braun	Melsungen (D)
Glaspetrishale	MAGV	Rabenau (D)
Hahnenbank, 5-fach	pub Medizintechnik	Kirchseen (D)
Neubauer Zählkammer	Brand	Wertheim (D)
Petrishale Ø 32 mm	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)
Petrishale Ø 94 mm	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Präparations-/OP-Besteck	Aesculap-B.Braun	Tuttlingen (D)
Reaktionsgefäße 0,5, 1, 2 ml	Brand	Wertheim (D)
sterile Einmalpipetten 1, 5, 10, 50 ml	Sarstedt	Nümbrecht (D)
sterile Glaspasteurpipette	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt (D)
Sterilfilter	Whatman	Dassel (D)
Tygon Schläuche f. Perfusionspumpe	Abimed	Langenfeld (D)
Vibratormkingen	Campden Instruments	Loughborough (UK)

5.4 Western Blot

Nitrocellulosemembran (162-0150)	Biorad Laboratories	München (D)
Blottingpapier (170-3959)	Biorad Laboratories	München (D)
Gelkammern	Biorad Laboratories	München (D)
Gelkämme	Biorad Laboratories	München (D)
Geltrocknungsrahmen	Roth	Karlsruhe (D)

5.5 In vivo Versuche

I.c.v. Führungskanülen C313G 22G 2,5 mm	Plastics One	Raonke (USA)
I.c.v. Injektionskanülen C313 2,7 mm	Plastics One	Raonke (USA)
I.c.v. Dummykanüle C313G 2,5 mm	Plastics One	Raonke (USA)
Hamilton Spritze 10 µl	Hamilton	Bonaduz (CH)
Polypropylenschlauch PP20 26G	Portex Limited	Hythe (UK)

5.6 RT-PCR

Zellkulturschaber	Thermo Scientific -Nunc	Langenselbold (D)
-------------------	-------------------------	-------------------

5.7 TNF- α und IL-6 Bioassays

Zellkulturflaschen	PAA	Pasching (AUT)
Zellkulturflaschen	Sarstedt	Nümbrecht (D)
96 Well Platten	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)

6. Software

Name	Version	Firma	Ort
AccuDiet	1.2	AccuScan Instruments	Columbus (USA)
AdobeReaderPlugin	10.0	Adobe Deutschland	Frankfurt (D)
DigiRead		Asys Hitech	Eugendorf (D)
Excel	2003/2010	Microsoft Deutschland	Bad Homburg (D)
GraphPad Prism	5.02	GraphPad Software	La Jolla (USA)
ImageJ	1.43u	Wayne Rasband	
Metafluor- Imaging Software für Mikroskope	4.5	Diagnostic Instruments-Vistron Systems	Puchheim (D)
Metamorph	5.05	Diagnostic Instruments-Vistron Systems	Puchheim (D)
Photoshop	5.5	Adobe Deutschland	Frankfurt (D)
Reference Manager	11.0	ResearchSoft	Carlsbad (USA)
SigmaStat		Systat Software	Erkrath (D)
VitalView	3.1	Minimitter Company	Sunriver (USA)
Word	2003/2010	Microsoft Deutschland	Bad Homburg (D)

II. Versuchstiere

Für alle Experimente dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche Wistar Ratten (Charles-River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) der institutseigenen Zuchtkolonie herangezogen. Eine Ausnahme stellte dabei der Vergleich des Immunfluoreszenznachweises für Apelin13 und Apelin17 in verschiedenen Rattenstämmen dar (De Mota et al., 2004). Hierfür wurden je vier männliche Wistar und Sprague-Dawley Ratten (ebenfalls Charles-River Laboratories) eingesetzt. Für die Etablierung der neuroglialen Primärkulturen und die Durchführung der Ca^{2+} -Imaging Experimente wurden 4-6 Tage alte Wistar Ratten beiderlei Geschlechts eingesetzt.

Die Haltung und Aufzucht der Tiere erfolgte in transparenten Polycarbonatkäfigen des Typs IV (38 x 59 x 18 cm / B x T x H) bei einer Raumtemperatur von 23 ± 1 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einer Beleuchtungszeit von 12:12 Stunden Licht:Dunkel (Licht an 7:00 Uhr, Licht aus 19:00 Uhr). Als Einstreu für die Käfige wurde „bedding SS14“ verwendet, welches alle sieben Tage ausgewechselt wurde. Die Tiere hatten in der Haltung der Zuchtkolonie *ad libitum* Zugang zu Ratten-Standardfutter (R-Z V132) und Wasser. Nach Erreichen des Absetzgewichts von 110 ± 10 g erfolgte eine Geschlechtertrennung und gruppierte Umsetzung von bis zu fünf Ratten ebenfalls in Typ IV Polycarbonatkäfige. Unter diesen Haltungsbedingungen verblieben die Ratten bis zum Versuchsbeginn und hatten zu diesem Zeitpunkt je nach Versuchsansatz ein Körpergewicht von 180-290 g. Die durchgeführten Tierversuche wurden beim Regierungspräsidium Hessen per Antrag genehmigt (v54-19 c20/15 (1) 18/2 Nr. 66/2011 und GI 18/2 Nr.43/2009). Die Tötung von Tieren zur Erstellung der primären Zellkulturen wurde unter v54-19 c20/15 cGI 18/2 und GI18/2-Nr.33/2009 angezeigt.

III. Methoden

1. Primäre Zellkultur

1.1 Neurogliale Primärkulturen des *Nucleus paraventricularis* (PVN), des *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) und des *Nucleus arcuatus* (ARC)

Wie schon in Teilen der Einleitung dargestellt, wird der Apelin-Rezeptor APJ in zahlreichen hypothalamischen Strukturen exprimiert. Dazu zählen unter anderem Kerngebiete mit Bedeutung für die zentrale Regulation autonomer Funktionen wie der *N. paraventricularis* des Hypothalamus (PVN). In diesem Kerngebiet wurde schon früh über eine hohe APJ-Expressionsdichte auf m-RNA- und Proteinebene berichtet (De Mota et al., 2000; Medhurst et al., 2003). Die in der Literatur beschriebene Verteilung von APJ ist - im Gegensatz zu der seines Liganden - in Bezug auf hypothalamische und extrahypothalamische Kerngebiete

wenig detailliert und beschränkt sich hauptsächlich auf mRNA Daten. Deshalb war es auch ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit, eine detailliertere Kartierung des APJ-Proteins im Gehirn der Ratte zu erstellen (Kap. 4.2.5). Anhand der dabei erhaltenen Ergebnisse ergab sich unter anderem für den *N. praeopticus medianus* (MnPO) eine ausgeprägte Dichte an APJ-immunreaktiven Faserstrukturen (Erg. Kap. II.4.1). Diese Struktur im anterioren Hypothalamus hat eine wichtige Bedeutung für die Homöostase der extrazellulären Körperflüssigkeit sowie der Körpertemperatur. Weiterhin konnten durch die Kartierungsstudie im *N. arcuatus* (ARC), einer für die Kontrolle des Energiehaushaltes wichtigen Struktur im caudoventralen Hypothalamus, zahlreiche APJ-positive Zellkörper detektiert werden (Erg. Kap. II.4.1).

Zur experimentellen *in vitro* Untersuchung der Funktionalität eines neuronal und möglicherweise auch glial exprimierten Apelin-Rezeptors in diesen spezifischen, hypothalamischen Kerngebieten wurden neurogliale Primärkulturen aus dem Bereich des PVN, des MnPO und eingeschränkt auch des ARC des neonatalen Rattengehirns verwendet. In diesen Kulturen konnten die durchgeführten funktionellen Untersuchungen spezifisch einzelnen Zelltypen zugeordnet werden. Eine angereicherte Primärkultur neonatalen Gehirngewebes verschiedener circumventrikulärer Organe (CVOs) war bereits am Institut durch Vorarbeiten am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung etabliert worden (Jurzak et al., 1994). Eine MnPO-angereicherte Primärkultur wurde, auf Basis dieses Protokolls, ebenfalls bereits vor Beginn der Doktorarbeit routinemäßig erstellt (Hitzel et al., 2007; Hitzel, 2009). Für die Präparation des MnPO aus coronalen Gewebeschnitten des neonatalen Rattengehirns diente vor allem die *Commissura anterior* als wichtige neuroanatomische Leitstruktur. Das heißt, es wurde das entsprechende Gewebe oberhalb (dorsaler MnPO - dMnPO) und unterhalb (ventraler MnPO - vMnPO) der selbigen oder bei noch nicht vollständig geschlossener Kommissur der Bereich des anterioren MnPO (aMnPO) zur Erstellung der Kultur verwendet (Abbildung 7A). Der an der Basis des Gehirns lokalisierte ARC lässt sich leicht durch seine Nähe zur charakteristischen Struktur der *Eminentia mediana* lokalisieren und entsprechend präparieren. Auch dieses Protokoll war bereits durch einen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe (E. Pollatzek) erarbeitet worden. Für die Etablierung einer neuroglialen Primärkultur des PVN mit differenzierten Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten sowie Mikrogliazellen hingegen musste für die Präparation aus coronalen Gehirnschnitten neonataler Ratten ein neues Präparationsprotokoll erarbeitet werden.

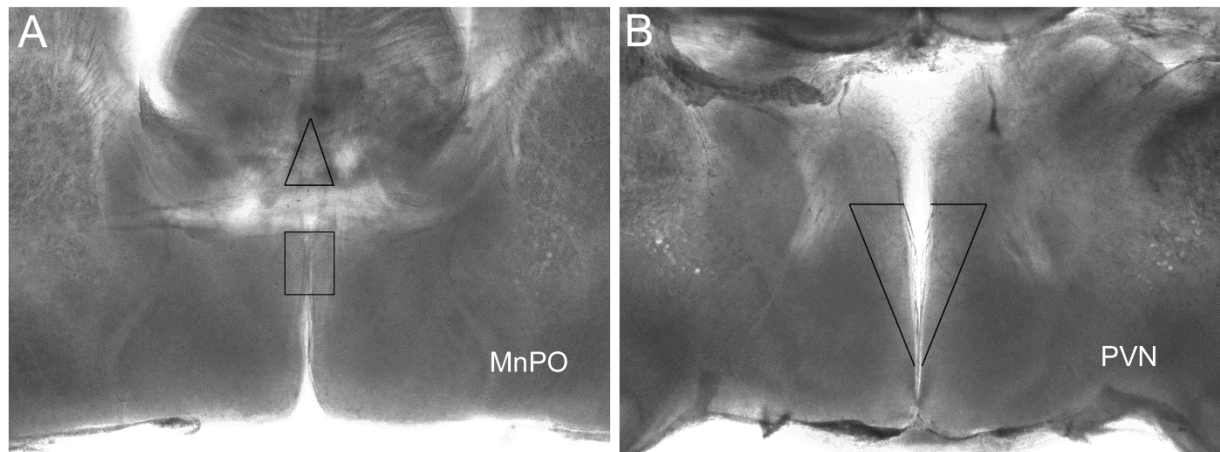


Abbildung 7: Fotografien von Vibratom-Frischgewebeschnitten (400 μm) neonataler (d 4-6) Rattengehirne mit den entsprechend markierten Exzisionsstellen zur Erstellung einer (A) MnPO- und (B) einer PVN-angereicherten neuroglialen Primärkultur.

1.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4)

28 mmol/l	Na_2HPO_4
72 mmol/l	NaH_2PO_4

- Neurobasal A (NBA) Zellkulturmedium (auf 37 °C vorgewärmt)

48 ml	Neurobasal A Medium
1 ml	B27 Medium
4 mmol/l	L-Glutamin
100 $\mu\text{g/ml}$	Penicillin/Streptomycin

- Gey's Balanced Salt Solution (GBSS); mit 5 % D-Glucose (20 min oxygeniert)
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, 20 min oxygeniert)

20 mmol/l	HEPES sterilfiltriert, pH 7,4
-----------	-------------------------------

- Dispase I-Enzymlösung

Oxygeniertes HBSS mit Dispase I (2 U/ml)

- Inaktivierungslösung

Oxygeniertes HBSS mit 20 mmol/l HEPES, 1 mmol/l EDTA

1.1.2 Anfertigung der Frischgewebeschnitte

Zur Vorbereitung der Präparation wurden die folgenden Schritte jeweils am Tag zuvor durchgeführt. Für die Zellkultur wurden mit 70 % Ethanol desinfizierte flexiPERM®-Mikro-12-Kammern mit 28 mm² Grundfläche verwendet. Dabei dienten je nach Versuchsansatz unterschiedliche Deckgläschen als Boden für diese Kammern. So wurden für die Calcium-Imaging Versuche sterile Cellocate® Deckgläschen mit einem eingetätzten Koordinatensystem zum besseren Wiederauffinden der Zellen nach der anschließend an die Messung durchgeführten Immunocytofluoreszenzmarkierung benutzt. Für alle weiteren Anwendungen kamen normale Deckgläschen (15 x 15 mm) zum Einsatz. Unter sterilen Arbeitsbedingungen unter einer *Laminar Flow* wurden diese oder die Cellocate® Deckgläschen mit einer Pinzette zentriert auf die glatte Unterseite der jeweiligen Kammern aufgesetzt. Um ein besseres Zellwachstum zu gewährleisten, wurden die Deckglasböden mit jeweils 200 µl Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) überschichtet und die Kulturschalen mit den Mikrokammern anschließend über Nacht bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Am nächsten Tag wurde erneut unter sterilen Bedingungen das überschüssige Beschichtungsmaterial durch eine sterile Glaspasteurpipette über ein Pumpensystem abgesaugt, die Kammern zweimalig mit sterilem, entionisiertem Wasser gewaschen und unter der *Laminar Flow* lichtgeschützt getrocknet.

Alle benötigten Lösungen wurden in sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen angesetzt. Anhand durch den Deckel gestochener Kanülen und aufgesetzter Sterilfilter wurden HBSS und GBSS für 20 min auf Eis über ein Schlauchsystem mit Carbogen begast. Zur späteren Inaktivierung der Dispase I-Aktivität wurden nach Abschluss der Begasung 10 ml der HBSS mit 1 mmol/l sterilfiltriertem EDTA versetzt.

Die Präparation der für die Erstellung der hypothalamischen Primärkulturen benötigten Kerngebiete PVN, MnPO und ARC wurde unter annähernd sterilen Bedingungen durchgeführt. Das heißt, dass alle benutzten Arbeitsplätze und Geräte zuvor mit 70 % Ethanol desinfiziert, das verwendete Präparationsbesteck sterilisiert sowie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße autoklaviert wurden.

Pro Präparationsansatz wurden jeweils fünf 4-6 Tage alte, neonatale Wistar Ratten beiderlei Geschlechts herangezogen. Diese wurden durch Dekapitation mit einer Schere rasch getötet und der Kopf zur Oberflächendesinfektion für 15 sec in ein Becherglas mit eiskaltem 70 % Ethanol überführt. Mittels Skalpell mit steriler Einmalklinge wurde die Kopfhaut vorsichtig um den Schädel eingeschnitten und anhand einer Pinzette von der Schädeldecke entfernt. Als nächster Schritt wurde mit einer Irisschere die dünne und weiche Schädeldecke ringsum vorsichtig eingeschnitten, ohne das Gehirn dabei zu verletzen, mit einer spitzen Pinzette nach caudal abgezogen und somit das Gehirn freigelegt. Mit einem weiteren Skalpell wurde das Gehirn durch einen senkrechten Schnitt wenige Millimeter vor Ende der beiden cerebralen Hemisphären durchtrennt. Mit einer kleinen gebogenen Schere konnten anschließend die *Bulbi olfactori* aus dem Siebbein gelöst werden. Danach wurde mit einem Spatel der vordere Teil des Gehirns (*Tel-* und *Diencephalon*) vorsichtig in rostrocaudaler Richtung aus dem Schädel gelöst, die *Nervi optici* durchtrennt, sowie das Gehirn entnommen und in eine Petrischale mit gekühltem oxygeniertem GBSS überführt.

Anhand von Gewebekleber (Histoacryl/Vetglue) wurde das so präparierte Gehirn mit der caudalen Schnittseite nach unten auf einem Teflonblock fixiert. Dieser wurde dann in die mit auf vorgekühltem GBSS (4 °C) gefüllte Kammer aus Polyethylen (5 x 8 x 12 cm/ H x B x L) eines Vibratoms so abgesenkt, dass das Gehirn vollständig mit Puffer bedeckt und mit der Cortexseite zur Vibratomklinge des Gerätes positioniert war. Bereits 10 min vor der Präparation sowie während der gesamten Schneideprozedur wurde die Kammer konstant mit sterilem Carbogen begast. Um den Puffer während dieser Zeit gekühlt zu halten, wurde die Kammer vor dem Befüllen mit einem zuvor bei -20 °C gelagertem sterilisiertem Metallblock bestückt. Das Gehirngewebe wurde coronal in 400 µm Schritten in der Kammer des Vibratoms geschnitten. Die den MnPO, PVN bzw. ARC enthaltenden Schnitte wurden sofort durch eine feuerpolierte sterile Glaspipette mit weiter Öffnung in zuvor bereitgestellte kleine Petrischalen mit auf 4 °C gekühltem oxygeniertem GBSS überführt. Unter dem Binokular (Stemi SV11) wurden die betreffenden Schnitte durch eine feine Pinzette auf dem Boden der Schale fixiert und MnPO, PVN bzw. ARC anhand einer feinen Augenschere exakt präpariert (*Abbildung 7*).

1.1.3 Identifikation des PVN im Gewebeschnitt

Auf Ebene des PVN fehlten makroskopisch sichtbare Leitstrukturen wie für die Präparation des MnPO oder des ARC. Um trotzdem eine Standardisierung und die Auswahl des richtigen Gewebeareals für die Präparation zu ermöglichen, wurde der Abstand vom Ende der *Commissura anterior* als Leitstruktur bis zum Beginn des PVN ermittelt. Dazu wurden Atlanten serieller, mit Kresylviolett gefärbter Gefrierschnitte (20 µm Schnittdicke) sowohl des Gehirns adulter als auch neonataler Ratten im Präparationsalter erstellt. Für das adulte Rattengehirn ergab sich bei der Ermittlung der Distanz eine Entfernung von 600 µm, für das neonatale Gehirn von 400 µm. Aufgrund dessen wurde bei der Präparation und dem Schneiden des Gewebes unmittelbar nach dem Ende der *Commissura anterior* ein 400 µm dicker Schnitt verworfen und aus dem darauffolgenden die schmetterlingsförmige Struktur des PVN dreiecksförmig mit feinen Augenscheren präpariert (Abbildung 7B).

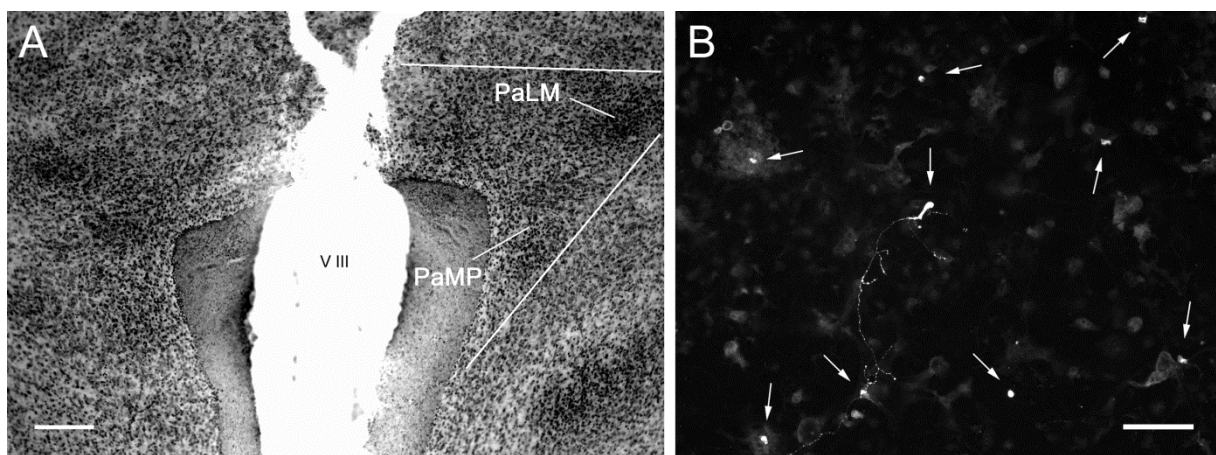


Abbildung 8: Überprüfung der Wahl der korrekten Excisionsstelle zur Erstellung der PVN-angereicherten Primärkultur. (A) Schwarz-Weiß Aufnahme eines mit Kresylviolett gefärbten Gefriergewebeschnitts (20 µm) aus dem Gehirn einer fünf Tage alten Ratte, angefertigt aus einem Vibratomschnitt (400 µm) zur Erstellung der PVN-spezifischen Primärkultur. Für den im Bereich der weißen Begrenzungslinien positionierten PVN lassen sich dessen magnozelluläre (PaLM) und periventrikuläre (PaMP) Komponente erkennen. V III= 3. Ventrikel (B) Immunfluoreszenzmarkierung an Zellen der PVN-angereicherten Kultur für den PVN-spezifischen Corticotropin-releasing-factor (CRF). Entsprechend immunpositive neurosekretorische Neurone sind durch Pfeile gekennzeichnet. Größenmarker A: 100µm; B: 50 µm

Neben dem ermittelten Abstand von *Commissura anterior* und PVN diente weiterhin der morphologische Vergleich mit den Kresylviolett-gefärbten Gewebeschnitten der zuvor

erstellten Atlanten (*siehe Kap. 1.1.4.2*) in den weiteren Präparationen der Ermittlung der korrekten Schnittausswahl. Ergänzend wurden in der Etablierungsphase mehrmals Kresylviolett-färbungen des für die Erstellung der Kultur infrage kommenden neonatalen Vibratomschnittes angefertigt (*siehe Kap. 1.1.4.3*). Eine Färbung dieser Art ist exemplarisch in *Abbildung 8A* dargestellt.

1.1.4 Histologische Kresylviolett (KV)-Färbungen

1.1.4.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- Phosphatgepufferte Saline (PBS)
- PFA-Lösung (4 %)
- Kresylviolettlösung

0,1 %	Kresylviolettacetat
0,25 %	reine Essigsäure
- Ethanol (100 %, 90 %, 70 %, 50 %)

1.1.4.2 Hypothalamische KV-Gefriergewebeschnittserien der neonatalen Ratte

Für die Etablierung einer PVN-angereicherten neuroglialen Primärkultur neonataler Ratten wurde ein Atlas des Gehirns einer Ratte im Präparationsalter von 4-6 Tagen benötigt. Dafür wurde wie in *Kap. 4.1.1* beschrieben, das Gehirn entnommen und in 4 % PFA für 24 Std. bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde, wie bei dem adulten Gehirn beschrieben, das Gewebe in 20 % Saccharoselösung inkubiert und danach schockgefroren. Anschließend wurde das gefrorene Gehirn mit Tissue Tec auf den Objekthalter des Cryostaten aufgeblickt und 20 µm dicke coronale Gefriergewebeschnitte angefertigt (*siehe Kap 4.1.2*). Diese wurden sofort auf vorgekühlte, mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger überführt. Mit diesen Objektträgern wurde eine Kresylviolett-färbung (von Hirsch und Peifer, 1955) durchgeführt. Kresylviolett ist ein Farbstoff, der die Nissl-Substanz, d.h. das endoplasmatische Retikulum von Neuronen und Gliazellen, anfärbt.

Vor Beginn der Färbeprozedur wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für 60 min in Histo-Clear inkubiert, danach kurz mit entionisiertem Wasser gewaschen, jeweils 2 x 2 min in 100 %, 90 %, 70 % und 50 % Ethanol inkubiert und anschließend für 30 sec in Kresylviolettlösung gefärbt. Danach wurde das Gewebe wieder jeweils 2 x 2 min mit der Alkoholreihe, diesmal jedoch in aufsteigender Reihenfolge, behandelt. Nach erneuter Inkubation für jeweils 2 min in Histo-Clear und anschließend Xylol wurden die Objektträger mit dem Einbettmedium Entellan und langen Deckgläschen (24 mm x 60 mm) überdeckt und lichtgeschützt gelagert.

1.1.4.3 Kresylviolettfärbung neonataler potentieller PVN Gehirnfrischgewebeschnitte

Zur Durchführung der Kresylviolettfärbung an neonatalen Gefrierschnitten wurden Vibratomschnitte (400 µm) des neonatalen Rattengehirns auf der Ebene des PVN in 0,1 mol/l PBS (4 °C) mit 4 % PFA für zweieinhalb Std. bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden sie zur Cryoprotektion für 60 min in eine 20 % Saccharoselösung transferiert, kurz in PBS gewaschen und auf Aluminiumfolie mit Einbettmedium (Tissue Tec) eingebettet. Danach wurde die Aluminiumfolie mit den Schnitten auf Trockeneis überführt und das Gewebe mit Einbettmedium tiefgefroren. Die so entstandenen Gewebe-Einbettmedium-Blöcke wurden zugeschnitten, von der Folie gelöst, herumgedreht und mit frischem Einbettmedium auf dem Objekthalter des Cryostaten festgefroren. Von dem so präparierten Gehirnschnitt wurden 20 µm Cryostatschnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen. Die folgenden Schritte der Kresylviolettfärbung wurden dann, wie oben bereits beschrieben, durchgeführt.

1.1.5 Präparation der Zellen

Die präparierten Kerngebiete (PVN, MnPO oder ARC) von fünf Gehirnen neonataler Ratten pro Präparation wurden sofort in die dem jeweiligen Gehirng Gebiet entsprechenden Schälchen mit oxygenierten HBSS überführt und unter der *Laminar Flow* mit einer sterilen 10 ml Einmalpipette in Dispase I-Enzymlösung (2 U/ml) transferiert und bei Carbogenbegasung durch einen Sterilfilter bei 37 °C für 45 min inkubiert. Dispase I hat gegenüber proteolytischen Enzymen wie Trypsin und Collagenase bzw. Enzymgemischen wie Pronase

den Vorteil, dass es den Gewebeverband gut auflöst aber nicht zu Schäden an den Zellmembranen führt und im Hinblick auf Temperatur, pH-Wert und Interferenz mit Serumkomponenten sehr stabil ist.

Nach Ablauf der Dispase I-Inkubation wurde die Enzym-Lösung mit einer 1000 µl Pipette vorsichtig abgenommen und die Gewebestücke zweimalig mit je 5 ml Inaktivierungslösung gewaschen, um die Enzymreaktion zu terminieren. Anschließend wurde das Gewebe in jeweils 5 ml NBA Medium (37 °C) dreimal gewaschen und mit einer 1000 µl Pipette durch Auf- und Abpipettieren in 1 ml NBA dissoziiert. Hierbei zeigte eine Trübung des Mediums die erfolgreiche Auflösung der Gewebestücke und Vereinzelung der Zellen an. Die Zellsuspension wurde in die vorbereiteten und vorgewärmten Zellkulturmikrokammern überführt und im Brutschrank bei 37 °C, einer CO₂-Konzentration von 5 % und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der erste Austausch des Mediums vorgenommen, um tote Zellen und Zelltrümmer aus den Kammern zu entfernen. Nach diesem Wechsel wurde das Medium nach drei Tagen erneut ausgetauscht. Nach 3-4 Tagen Wachstums- und Differenzierungszeit konnten die Zellen der neuroglialen Primärkulturen zur Durchführung der Experimente verwendet werden.

1.1.6 CRF-Markierung in der neuroglialen PVN-Kultur

Während der Etablierungsphase und bei den nachfolgenden Präparationen wurden zu Kontrollzwecken regelmäßig Immunfluoreszenzmarkierungen mit einem Antikörper für *Corticotropin-releasing-factor* (CRF, 1:500) an den kultivierten Zellen der PVN-spezifischen Primärkultur durchgeführt. Dieses Neuropeptid wird ausschließlich im Bereich des parvozellulären PVN produziert (Tohyama et al., 1998). Bei diesen Markierungen enthielt die Kultur stets CRF-immunreaktive Zellen (*siehe Abbildung 8B*).

1.2 Primärkultur des Hypophysenzwischenlappens (HZL)

Eine immunhistochemische Untersuchung zur zellulären APJ-spezifischen mRNA-Expression in der Hypophyse der Ratte deutete auf eine spezifische Markierung einzelner Zellen im

Bereich des Hypophysenvorderlappens (HVL) hin (De Mota et al., 2000). Auch für den Hypophysenzwischenlappen (HZL) konnte APJ-spezifische mRNA demonstriert werden (Reaux-Le et al., 2007). Der über die Beschreibung der hypophysären APJ mRNA-Verteilung hinausgehende immunhistochemische und cytochemische Nachweis des APJ Proteins in Zellen des HVLs, vor allem jedoch des bis *dato* auf Proteinebene nicht untersuchten HZLs stellt darüber hinaus einen Teilaspekt der vorliegenden Promotionsarbeit dar (*Erg. Kap. II.2 u. III.2*). Um funktionelle Untersuchungen eines in spezifischen Zellen des HZLs exprimierten Apelin-Rezeptors durchführen zu können, musste eine Primärzellkultur des HZLs etabliert und entsprechend verwendet werden.

1.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- Phosphatpuffer (PBS)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Zellkulturmedium

43,5 ml	DMEM
10 %	fetales Kälberserum (FCS)
4 mmol/l	L-Glutamin
100 µg/ml	Penicillin/Streptomycin

- Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, 20 min oxygeniert)

Lösung für Präparationsschalen

- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, 20 min oxygeniert)

20 mmol/l HEPES sterilfiltriert, pH 7,4

- Dispase I-Enzymlösung

Oxygeniertes HBSS mit Dispase I (2 U/ml)

- Inaktivierungslösung

Oxygeniertes HBSS mit 20 mmol/l HEPES, 1 mmol/l EDTA

1.2.2 Präparationsprotokoll

Für die Präparation einer Primärkultur HZL-spezifischer Zellen wurden männliche Wistar-Raten mit einem Körpergewicht von 250-300 g herangezogen. Dabei wurden in der

Etablierungsphase sowie für die Anzucht der Primärkultur auf Deckgläschen zum Zweck immunocytochemischer Untersuchungen jeweils zwei Ratten pro Präparation eingesetzt. Für den semiquantitativen Nachweis des APJ Proteins (*siehe Kap. 6.1*) und die Untersuchungen zur Phosphorylierung der *extracellular regulated kinase* (ERK) 1/2 mittels Western Blot Analyse (*siehe Kap. 6.2*) kamen vier Tiere pro Präparation zum Einsatz. Für die Durchführung der Versuche zur Detektion der ERK1/2-Aktivität wurden die HZL-Zellen ausschließlich in 12-Well-Platten kultiviert.

Zur Durchführung der immunocytochemischen Markierungen wurde das gleiche, mit 70 % Ethanol desinfizierte, Mikrokammersystem (Flexiperm®) wie für die neurogliale Primärkultur des PVN bzw. MnPO verwendet. Unter sterilen Arbeitsbedingungen (*Laminar Flow*) wurden ebenfalls mit einer Pinzette sterile Deckgläschen zentriert auf die glatten Unterseiten der Kammern aufgesetzt und bildeten somit die Böden der Mikrokulturkammern. Um ein besseres Zellwachstum zu gewährleisten, wurden sowohl die Deckglasböden der Kammern als auch die 12-Well-Platten mit jeweils 200 µl bzw. 1 ml Poly-L-Lysin beschichtet. Sowohl die Kulturschalen mit den Mikrokammern als auch die 12-Well-Platten wurden anschließend über Nacht bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Die Vorbereitung der Medien (DMEM, EBSS, HBSS) und Lösungen (Dispaelösung, Inaktivierungslösung) erfolgte ebenfalls wie unter *Kap. 1.1.2* dargestellt.

Die Präparation des für die Primärkultur verwendeten HZL-Gewebes wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt, wofür alle benutzten Arbeitsplätze und Geräte zuvor mit 70 % Ethanol desinfiziert, das verwendete Präparationsbesteck sterilisiert sowie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße autoklaviert wurden. Dreißig min vor Beginn der Präparation wurden 2-4 adulte Ratten in abgedunkelte Einzelkäfige verbracht, danach mit 64 mg/Tier Narcoren i.p. in tiefe Narkose versetzt und durch eine Guillotine rasch dekapitiert.

An dem kurzzeitig in eisgekühltes PBS überführten Kopf wurde mit einer Gewebeschere die Kopfhaut sagittal eingeschnitten und von der Schädeldecke entfernt. Anschließend wurde mit einem kleinen Rongeur die am Kopf verbliebenen Halswirbel sowie die Halsmuskulatur entfernt, und vom *Foramen magnum* ausgehend die Schädeldecke abgetragen, so dass das gesamte Gehirn frei lag. Mit einem Spatel wurde dieses dann vorsichtig, an der *Medulla oblongata* beginnend, aus dem Schädel gelöst, mit einer kleinen, gebogenen und spitzen Schere die Sehnerven und Bulbusfäden durchtrennt und dann entnommen. Darauf folgend

wurden die Hirnhäute oberhalb der Hypophyse durchtrennt und das Gewebe mit einem Spatel aus der *Fossa hypophysialis* entnommen und in eine Petrischale mit gekühltem, oxygenierten EBSS überführt (schematische Zeichnung siehe *Abbildung 9*). Nachdem bei allen Tieren die Hypophyse entnommen war, wurde unter dem Binokular das Hypophysengewebe so gedreht, dass der Hinterlappen oben lag und mit einer kleinen Pinzette fixiert werden konnte. Anhand einer zweiten Pinzette, einer Augenschere oder eines Spatels ließ sich das Hinter- und Zwischenlappengewebe leicht vom Vorderlappen ablösen.

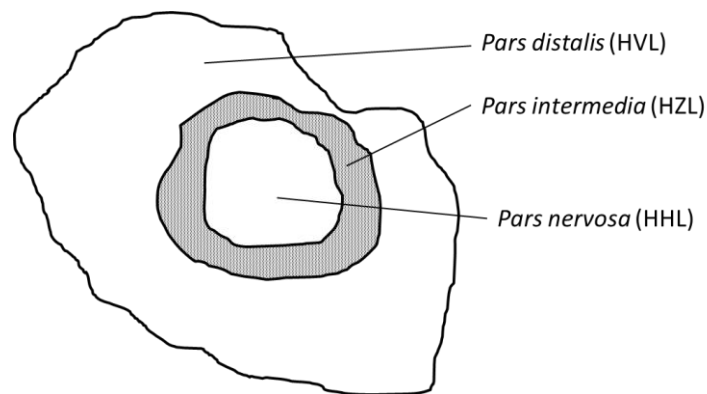


Abbildung 9: Schematische Darstellung der präparierten Hypophyse der Ratte in Aufsicht: HVL-Hypophysenvorderlappen, HZL-Hypophysenzwischenlappen, HHL-Hypophysenhinterlappen.

Das herausgelöste Gewebe wurde anschließend mit der glatten Hinterlappenseite zum Betrachter gedreht und erneut mit einer Pinzette fixiert. Danach wurde mit einer aus einer Injektionskanüle selbst angefertigten Stanzkanüle (\varnothing 1,2 mm) das in der Mitte liegende Hinterlappengewebe so ausgestanzt, dass nur noch das äußere, kranzförmige Zwischenlappengewebe zurückblieb. Durch eine kantenfreie sterile Glaspipette wurden die so gewonnenen Gewebestücke in eine kleine Petrischale mit oxygenierten HBSS überführt und anschließend mit einer Pipette (1000 μ l), bei welcher die Spitze abgeschnitten und die Kanten durch Abflammen abgerundet wurden, in die Dispase I-Enzymlösung bei einer Endkonzentration von 1 mg/ml überführt.

Für die 90-minütige Behandlungsdauer mit Dispase I wurden die HZL-Gewebestücke im Wärmeblock bei 37 °C mit Carbogen in einem 15 ml Röhrchen steril begast. Alle 30 min wurden sie durch Schwenken des Röhrchens kurz aufgewirbelt. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Enzymlösung vorsichtig abpipettiert, die Gewebestücke mit 5 ml Inaktivierungslösung gewaschen und das Röhrchen für 5 min bei 4 °C und 1000

Umdrehungen pro min (RPM) zur Entfernung fragmentierter Zellen zentrifugiert. Spätere Untersuchungen ergaben eine höhere Zellausbeute in der späteren Zellsuspension, wenn die Enzymlösung nach der Inkubation nicht abgenommen wurde, sondern sofort die EDTA-Inaktivierungslösung direkt zugegeben und anschließend ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt durchgeführt wurde. Deshalb wurde das Präparationsprotokoll bei allen später durchgeführten Präparationen auf diese Weise abgewandelt.

Nach der ersten Zentrifugation wurde der Überstand erneut abpipettiert, die Zellen nochmals mit 5 ml Inaktivierungslösung gewaschen, durch mehrmaliges leichtes Antippen des Röhrchens das Pellet aufgelöst und erneut zentrifugiert. Diese Prozedur wurde anschließend zweimal mit jeweils 5 ml DMEM wiederholt. Nach Abschluss der letzten Zentrifugation wurde das Medium erneut abgenommen und das verbleibende Zellpellet in 500 µl DMEM mit einer Eppendorfpipette (1000 µl) resuspendiert. Anhand einer Zählkammer wurde die Zellzahl pro ml durch Auszählen von zehn Kleinquadraten bestimmt. Die so erhaltene Zellzahl betrug im Mittel $3,41 \pm 0,24 \times 10^7$ Zellen pro ml ($n = 10$ Präparationen). Mit vorgewärmten DMEM wurde auf die ausplattierte Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ pro ml verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden je nach Versuchsansatz entweder je 350 µl in die Zellkulturmikrokammern bzw. 500 µl in die Wells der 12-Well-Platte überführt und diese dann im Brutschrank bei 37 °C, einer CO₂ Konzentration von 5 % und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Der erste Mediumwechsel erfolgte bei allen Kulturen am darauffolgenden Tag. Bei der Inkubation in den 12-Well-Platten wurden dazu die 500 µl der ursprünglichen Zellsuspension vom vorherigen Tag gegen 2 ml frisches Medium ausgetauscht. Danach wurde bei allen Kulturen das Medium alle drei Tage ausgetauscht. Nach einer Wachstums- und Differenzierungszeit von 7-9 Tagen wurde die HZL-Primärzellkultur für die Versuche verwendet.

Für die Detektion der Phosphorylierung von ERK1/2 nach apelinergener Stimulation anhand von Western Blot Analyse wurden neben den HZL-Zellen auch von F. Fuchs präparierte Zellen einer Hypophysenvorderlappenkultur eingesetzt. Diese wurden dazu analog wie die HZL-Kultur mit dem gleichen Medium in 12-Well-Platten gezogen und konnten ebenfalls nach 7-9 Tagen Differenzierungs- und Wachstumszeit für die Versuche eingesetzt werden

2. Ca^{2+} -Ratio Imaging: Untersuchungen zur apelinergen Ca^{2+} -Signaltransduktion

Calcium spielt im ZNS eine essentielle Rolle zum einen bei der Freisetzung von Neurotransmittern am synaptischen Spalt (Wheeler et al., 1994 und Review: Sudhof, 2011) und zum anderen als *second messenger* in Neuronen und Astrozyten bei der Vermittlung glial-neuronaler und glial-gliale Kommunikation (*siehe Einleitung*).

2.1 Grundlagen der Messtechnik

Zur Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in einzelnen Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen der neuroglialen Primärkulturen aus PVN und MnPO nach apelinergen Stimulation wurde deshalb die Ratio-Imaging Technik herangezogen (Jurzak et al., 1995; Gebke et al., 1998; Wuchert et al., 2009). Diese Methode stellt eine effiziente Möglichkeit zur Untersuchung der Transmitter-induzierten intrazellulären Signaltransduktion in neuroglialen Co-Kulturen der beiden genannten Gebiete dar.

Die für das Calcium-Imaging verwendeten Fluorophore machen sich die Indikatoreigenschaften intrazellulärer, hochselektiv Calcium-bindender Moleküle wie Calmodulin oder Calbindin zunutze. Bis heute wurde eine große Anzahl unterschiedlichster Moleküle für die verschiedensten Anwendungen entwickelt. Hierbei lassen sich neue, genetisch kodierte Biosensormoleküle von den traditionell eingesetzten chemischen Fluoreszenzfarbstoffen unterscheiden. Die genetisch kodierten Moleküle können anhand eines speziellen Promotors gezielt in bestimmte Kompartimente stabil oder transient transfizierter Zellen in der Kultur bzw. im Gewebe eingebracht werden. Der Vorteil der chemischen Farbstoffe liegt hingegen in ihrer großen Variabilität und der Einfachheit ihrer Handhabung. Dabei bedingen unterschiedlich starke Calciumaffinitäten auch Unterschiede in der Sensitivität der verschiedenen Indikatoren. Die chemischen Indikatorstoffe werden drüber hinaus in Einzelwellenlängen- und ratiometrische Calciumindikatoren unterteilt (Paredes et al., 2008). Einzelwellenlängenindikatoren wie zum Beispiel Rhod-2 oder die Fluo-Indikatoren ändern bei Calciumbindung proportional ihre Fluoreszenzintensität bei Anregung im identischen Wellenlängenbereich. Bei den ratiometrischen Indikatoren hingegen kommt es

nach Calciumbindung zu einer Verschiebung der maximalen Exzitations- oder Emissionsspektren. Ein Beispiel hierfür ist Fura-2, einer der bekanntesten Calciumindikatoren, der als der Standard für quantitative intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen dient (Paredes et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Fluorophor mit Ca^{2+} -Chelatoreigenschaften ebenfalls benutzt. Seine Entwicklung wurde 1985 von der Gruppe um Tsien et al. publiziert (Grynkiewicz et al., 1985). Grundlage für seine Struktur ist der Calciumchelator EGTA. Die calciumgebundene Form des Fura-2 zeigt bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 335 nm ihr Absorptionsmaximum, die calciumfreie Form bei 363 nm. Die maximale Emission bleibt hingegen bei beiden Formen relativ unverändert bei ungefähr 510 nm (calciumgebundenes Fura-2: 505 nm, calciumfreies Fura-2: 512 nm).

In der Praxis - so auch in der vorliegenden Arbeit - benutzt man jedoch für die Anregung der calciumfreien Form Licht der Wellenlänge von 340 nm und für die calciumgebundene Form von 380 nm. Durch Ratiobildung der bei 510 nm gemessenen Fluoreszenzintensitäten ergibt sich der größte dynamische Bereich für calciumabhängige Fluoreszenzsignale (*Abbildung 10*). Außerdem wird die Nähe zum isosbestischen Punkt des Fura-2-spezifischen Emissionsspektrums vermieden. An diesem Punkt hat eine Änderung der zu messenden zellulären Calciumkonzentration keinen Einfluss auf die Intensität der Fluoreszenz. Er liegt bei der Messung in lebenden Zellen bei 358 nm (Malgaroli et al., 1987).

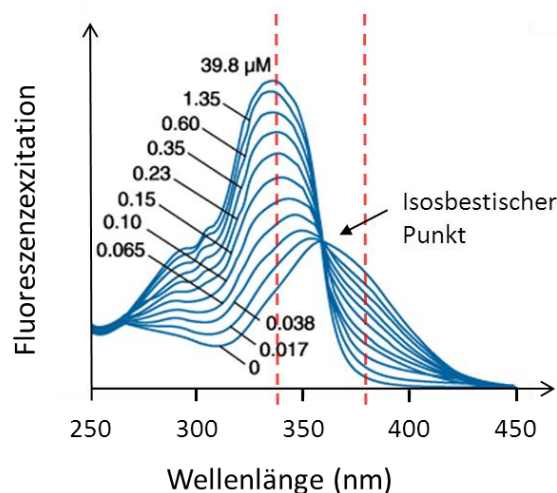


Abbildung 10: Exzitationsspektren von Fura-2 bei konstanter Emissionswellenlänge (510 nm) in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge sowie der Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen. Die für die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) herangezogenen Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm sind durch die gestrichelten Linien (rot) gekennzeichnet. Lage des isosbestischen Punktes bei 358 nm.

Durch die Anregung des Fura-2 bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen und die Ratio-Bildung der gemessenen Emissionslichtstärke ließen sich einige Faktoren minimieren, die einen Einfluss auf die Messung haben können, da diese beide Messungen gleichermaßen betreffen sollten. Zu diesen Faktoren zählten eine ungleichmäßige Verteilung des Farbstoffs in den Zellen, unterschiedliche Zelldicken bei der Messung und die Effektivität der verwendeten Instrumente (Tsien et al., 1985). Zusätzlich kann eine Beeinflussung der Messergebnisse durch das Auftreten von Ausbleicheffekten im Vergleich zur Messung bei nur einer Wellenlänge stark reduziert werden.

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \times Q$$

Abbildung 11: Formel zur Berechnung der intrazellulären Calciumkonzentration bei einer Ratio-Imaging-Messung mit Fura-2 (nach Grynkiewicz et al., 1985). $[Ca^{2+}]_i$ = intrazelluläre Calciumkonzentration, K_d = Dissoziationskonstante von Fura-2 für Calcium, R = Ratio der Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 340 und 380 nm, R_{min} = Ratio von Fura-2 in calciumfreier Lösung, R_{max} = Ratio von calciumgesättigtem Fura-2, Q = Quotient der Proportionalitätskoeffizienten S_{f2} (calciumfreies Fura-2) und S_{b2b} (calciumgesättigtes Fura-2) bei jeweils 380 nm Anregungswellenlänge.

Die in der vorliegenden Arbeit bei einer Frequenz von 0,5 Hertz ermittelten Ratiowerte (R) sind proportional zur absoluten intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$), welche jeweils über die Gleichung in *Abbildung 11* nach Kalibrierung des Systems mit bekannten Calciumkonzentrationen bestimmt werden kann. Aufgrund der unterschiedlichen Affinität der verschiedenen Indikatoren zu Calcium unterscheidet man diese in niedrigaffine und hochaffine Calciumindikatoren. Fura-2 wird dabei in die zweite Klasse eingeteilt. Seine Dissoziationskonstante K_d für Calcium liegt bei 145 nmol/l.

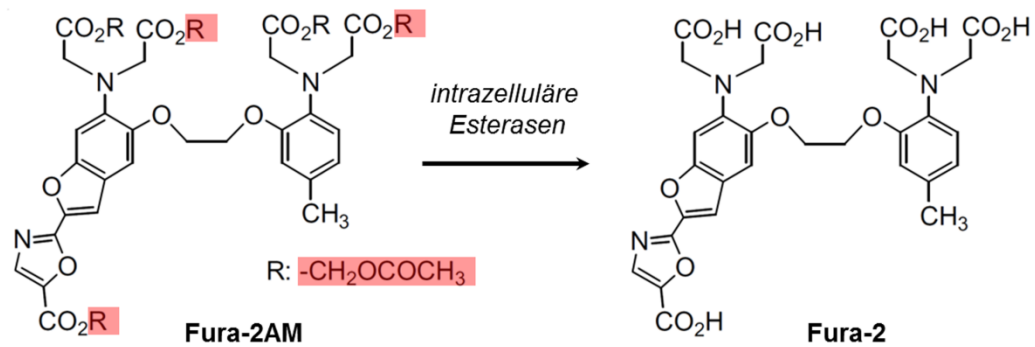


Abbildung 12: Hydrolysereaktion der Acetoxymethyl-Gruppen (rot) von Fura 2-Acetoxymethyl (Fura-2AM) zu Fura-2 durch intrazelluläre Esterasen. Durch diese Reaktion findet eine Aktivierung des membranpermeablen inaktiven Fura-2AM zum aktiven membranimpermeablen Farbstoff Fura-2 statt (Verändert nach MobiTec Fura-2AM Datenblatt).

Aufgrund der relativ hydrophoben Eigenschaften des Fura-2-Moleküls wird für die Messung in lebenden Zellen meist die Acetoxymethyl-Form (Fura-2AM) verwendet, da diese Modifikation zu einer hydrophileren Struktur des Moleküls führt und dieses somit für die Zellmembran permeabler macht. Nach der Penetranz des Fura-2AM in die Zelle können intrazelluläre Esterasen die AM-Gruppen abspalten und dadurch den Farbstoff aktivieren (Abbildung 12). Durch die daraus resultierende Impermeabilität des Moleküls für die Membran kann der Indikator in der Zelle festgesetzt werden und diese nicht mehr verlassen.

2.2 Durchführung der Messungen

2.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- Ca²⁺-Imaging Messpuffer (pH 7,4)

5 mmol/l	Na-HEPES	1,30	g/l
130 mmol/l	NaCl	7,60	g/l
10 mmol/l	Glucose	1,98	g/l
5 mmol/l	KCl	0,373	g/l
1 mmol/l	MgCl ₂	0,203	g/l
1,25 mmol/l	CaCl ₂	0,184	g/l

- Fura-2 Lösung
NBA-Medium mit 2 $\mu\text{mol/l}$ Fura-2
- Fura-2-Stocklösung in DMSO (1 mmol/l)
- L-Glutamat-Stocklösung (100 mmol/l)
- PyrAp13-Stocklösung (100 $\mu\text{mol/l}$)

2.2.2 Versuchsvorbereitung

Die mit neuroglialen Zellen aus den entsprechenden hypothalamischen Substrukturen (PVN, MnPO), angereicherten Primärkulturen wurden jeweils 4-5 Tage nach der Zellpräparation für die Imaging-Versuche verwendet. Vor Beginn jeder Messung wurden diese mit dem Calciumindikator Fura-2AM (2 $\mu\text{mol/l}$) bei 37 °C im Inkubator für 50 min beladen. Aufgrund der hohen, 500-fachen Verdünnung im NBA-Medium und der kurzen Expositionszeit konnten mögliche toxische Effekte des DMSO (0,2 %) als gering eingestuft werden (Hanslick et al., 2009). Nach Ablauf der Beladungszeit wurde die Fura-2AM Lösung durch dreimaliges Waschen mit vorgewärmtem (37 °C) Imaging-Messpuffer entfernt. Danach wurde das Gläschen mit den Zellen mit einer Pinzette vorsichtig von der Flexiperm-Silikonmikrokammer abgelöst und anschließend in die Messkammer eingespannt. Dazu wurde es mit der Zellseite nach oben auf die mittige Aussparung (\varnothing 1 cm) einer Stahlscheibe mit 11 cm Durchmesser aufgesetzt (*Abbildung 13*). Ein Ring aus Teflon mit 4 cm Durchmesser und zur Öffnung in der Mitte hin abgeschrägter Oberfläche wurde auf die Stahlscheibe mit dem Cellocare® Deckgläschen aufgelegt und mit vier Schrauben fixiert. Diese Teflonscheibe bildete gleichzeitig die Messkammer mit einem Volumen von 1 ml (*Abbildung 13*). Sofort nach dem Zusammensetzen der Kammer wurde diese, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, mit vorgewärmtem Messpuffer (37 °C) befüllt.

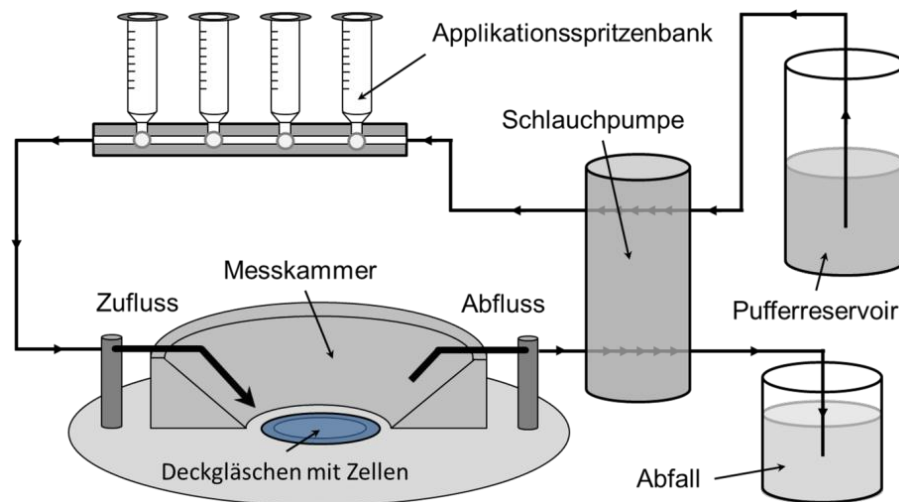


Abbildung 13: Schematischer Aufbau des Calcium-Imaging- und Superfusions-Systems mit Applikationsvorrichtung zur Stimulation der Zellen durch unterschiedliche Substanzen.

Anschließend wurde die Metallscheibe mit der Kammer in die Öffnung des Objektisches des inversen IMT-2 Mikroskops eingesetzt und an ein Schlauchsystem mit Schlauchpumpe angeschlossen. Während der Versuche wurde die Messkammer darüber ständig mit einer Flussrate von 2 ml/min mit frischem, unmittelbar vor der Messung vorgewärmten Messpuffer (37 °C) durchspült. Der Zu- und Abfluss dieses Systems bestand aus gebogenen Kanülen, wobei sich erstere unmittelbar am unteren Rand der Kammer über dem Gläschen mit den Zellen befand. Der Abfluss befand sich am oberen Rand der Messkammer. Dadurch konnte ein kontinuierlicher Austausch des Kammerinhaltes erreicht werden. Über eine mittels Schlauchsystem mit der Messkammer verbundene Spritzenbank konnten PyrAp13, L-Glutamat oder KCl direkt in die Messkammer appliziert werden.

Zur Anregung des in den Zellen befindlichen Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 wurde kohärentes Licht einer Quecksilberdampfampe, welches abwechselnd durch spezifische Filter eines rotierenden Filterrades gelenkt wurde, sodass monochromatisches Licht der Wellenlängen 340 bzw. 380 nm die Zellen erreichte. Um ein übermäßiges Ausbleichen des Fura-2 zu verhindern, ermöglichte eine Steuereinheit eine nur kurzzeitige Belichtung der Zellen bei der Licht der Anregungswellenlängen 340 bzw. 380 nm anhand eines dichromatischen Spiegels im Mikroskop auf die Messkammer geleitet wurde. Das emittierte Licht der so angeregten Fura-2-beladenen Zellen gelangte durch das jeweilige Fluoreszenzobjektiv, einen Sperrfilter (515 nm) sowie einen dichromatischen Spiegel in eine gekühlte CCD-Restlichtkamera. Aus

den Bildern des emittierten Lichts der Anregungswellenlängen 340 und 380 nm wurde mittels der Software Metafluor der Quotient der Intensitäten der zur Messung markierten Regionen bestimmt. Dieser war direkt proportional zur intrazellulären Calciumkonzentration zum Zeitpunkt der Aufnahme.

2.2.3 Versuchsdurchführung

Vor Beginn jedes Versuches wurde die erfolgreiche Beladung der Zellen mit Fura-2AM unter dem Mikroskop überprüft und jeweils eine zur Messung geeignete Region des Cellocate® ausgewählt. Hierfür wurde ein Bereich mit möglichst einzeln liegenden Zellen verwendet, um eine direkte Interaktion der Zellen nach Superfusionsstimulation zu minimieren. Danach wurden mit der Software Metamorph (Version 5.05) die zu messenden Zellregionen als „regions of interest“ markiert. So konnte die gemessene Aktivität direkt den einzelnen Zellen zugeordnet und bei der Auswertung entsprechend evaluiert werden. Anschließend wurde für einen Zeitraum von 5-10 min die basale $[Ca^{2+}]_i$ der Zellen aufgezeichnet und dann mit dem Stimulationsprotokoll begonnen (*Abbildung 14*).

Zu Beginn der Messungen wurden zunächst Dosis-Wirkungs-Untersuchungen an Zellen der PVN- und MnPO-Kulturen bei Superfusion mit steigenden Konzentrationen an PyrAp13 (10^{-8} - 10^{-6} mol/l) durchgeführt. Diese wurden später jedoch aufgrund des geringen Prozentsatzes an direkt responsiven Zellen nicht weiter ausgeführt (*siehe Ergebnisse Tabelle 11*).

Aufgrund der geringen direkten Responsivität der Zellen auf die Stimulation mit PyrAp13 wurde für alle weiteren Versuche ein anderes Protokoll angewandt. Da viele der peptidergen Neurotransmitter unter anderem modulierend auf primäre respektive sekundäre intrazelluläre Signalwege klassischer Neurotransmitter wie Glutamat oder GABA einwirken (van den Pol et al., 1998; Gao und van den Pol, 2001; Bacci et al., 2002), sollte deshalb der Einfluss von PyrAp13 auf die Glutamat-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen des PVN bzw. MnPO untersucht werden. Das dazu in 40 Wells, basierend auf 16 Zellpräparationen, für den PVN, und 24 Wells, basierend auf elf Zellpräparationen, für den MnPO verwendete Untersuchungsprotokoll ist schematisch in *Abbildung 14* dargestellt. Alle Superfusionsstimulationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

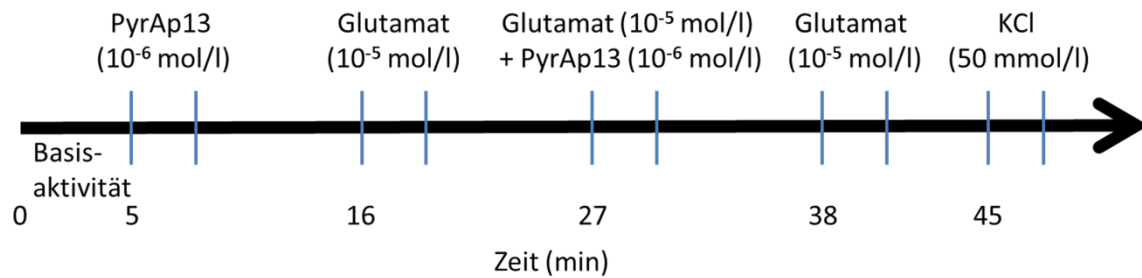


Abbildung 14: Graphische Darstellung der zeitlichen Abfolge und Dauer der Stimuli des für das Calcium-Imaging verwendeten Messprotokolls. PyrAp13 = Apelin13 (pyroglutamylierte Form), KCl = Kaliumchlorid

Als erster Stimulus wurde dabei PyrAp13 in der finalen Konzentration von 10^{-6} mol/l in Messpuffer für 3 min über die Spritzenbank und das Schlauchsystem appliziert. Zur Auswaschung von PyrAp13 wurden anschließend die Zellen in der Messkammer für 8 min konstant mit Messpuffer superfundiert. Im Folgenden wurden L-Glutamat (10^{-5} mol/l), dann L-Glutamat mit PyrAp13 (10^{-6} mol/l) und L-Glutamat (10^{-5} mol/l) wiederum alleine für jeweils 3 min bei intermittierenden Waschphasen von 8 min superfundiert. Am Ende jeder Messung wurde abschließend als Vitalitätstest und zur besseren Unterscheidung von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen Messpuffer mit erhöhtem Kaliumgehalt (KCl 50 mmol/l) superfundiert. KCl führt bei intakten Neuronen zu einer charakteristischen Depolarisation und damit verbundenem Calciumeinstrom. Während des gesamten Versuchs übermittelte die zur Messung verwendete Software die ermittelten Ratiowerte direkt in ein Excel-Datenblatt, welches dann später zur Auswertung verwendet wurde.

Aufgrund immunhistochemischer Markierungen dieser Arbeit konnte eine ausgeprägte Co-Lokalisation von APJ und neuronaler Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) im PVN und MnPO festgestellt werden. Um eine mögliche Interaktion der beiden Systeme in den PVN- und MnPO-spezifischen Kulturen zu untersuchen, war es deshalb ein Ziel dieser Studie, eine Modulation des glutamatergen Signals speziell in nitrergen Zellen zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen jedes Well nach Ablauf einer Messung mit 4 % PFA fixiert und entsprechende immuncytochemische Markierungen durchgeführt. Dabei konnten, anhand der zusätzlichen Verwendung von Zelltyp-spezifischen Markern, die digitalisierten intrazellulären Calciumsignale eindeutig einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden (siehe 4.3.3).

2.2.4 Datenevaluierung

Die anhand der Software auf Excel-Datenblättern digital aufgezeichneten Daten konnten anschließend direkt in diesem Programm ausgewertet werden. Dazu wurde für jede gemessene Zelle nach jeder Stimulation die absolute Ratioänderung eines möglicherweise auftretenden Peaks bezüglich der vorherigen Basislinie ermittelt.

Für die Auswertungen berücksichtigt wurden lediglich Ratioänderungen (ΔRatio) $\geq 0,05$. Darüber hinaus wurden nur solche nach dem in *Abbildung 14* dargestellten Schema erarbeiteten Calciumsignale in die finale Auswertung übernommen, bei denen gewährleistet war, dass die Zelle jeweils mit einem vergleichbaren Calciumsignal auf den ersten und dritten Glutamatstimulus reagierten. Als weiteres Ausschlusskriterium für untersuchte Neurone galt, wenn die gemessene Zelle keine Responsivität auf den am Ende jeder Messung durchgeführten Vitalitätstest mit Kaliumchlorid zeigte. Auch Zellen, die während der Messung eine Drift der Basislinie aufwiesen, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Zusätzlich wurden Zellen ausgeschlossen, deren Ratiowert nach einer Stimulation nicht mehr auf eine stabile Basislinie zurückkehrte. All diese Maßnahmen sollten dazu dienen, die Daten möglicherweise nicht mehr vitaler Zellen von den Auswertungen auszuschließen.

Unter Berücksichtigung all dieser Kriterien wurden alle repetitiv mit Glutamat (10^{-5} mol/l) ohne Desensibilisierungseffekte aktivierbaren Zellen nach immunocytochemischer Bestimmung ihres Zelltyps (*Kap. 4.3.3*) je nach Antwortverhalten auf den kombinierten Reiz (PyrAp13+Glut) in drei Gruppen unterteilt. Bei der ersten Gruppe kam es bei gleichzeitiger Stimulation mit PyrAp13 zu einer Abschwächung des glutamaterg bedingten Calciumeinstroms. Die zweite Gruppe hingegen, zeigte einen verstärkten Calciumeinstrom bei der Superfusion mit beiden Substanzen. Die dritte Gruppe wiederum zeigte keine Änderung des Calciumeinstroms, wenn der kombinierte mit der alleinigen glutamatergen Stimulation verglichen wurde. Für die abschließende Auswertung dieser Gruppen wurde der Mann-Whitney U-Test zur statistischen Signifikanzanalyse verwendet. Unterschiede zwischen der Doppelbehandlung und dem vorherigen (*-***) und nachfolgenden (#-###) alleinigen Glutamat-Stimulus wurden mit einem $p \leq 0,05$ (#/*), $p \leq 0,01$ (##/**) und $p \leq 0,001$ (###/***) als statistisch signifikant erachtet.

3. *In vivo* Experimente

Um Rückschlüsse auf zentralnervös bedingte physiologische Effekte des Apelins ziehen zu können, wurde der Einfluss von intracerebroventrikulär (i.c.v.) appliziertem PyrAp13 auf 1.) die Lipopolysaccharid (LPS) -induzierte Fieberantwort, 2.) die Angiotensin II (AngII)-induzierte Trinkantwort und 3.) die circadiane Rhythmik der Körpertemperatur, Lokomotion und Futter-/Wasseraufnahme untersucht. Dazu wurden neuronale Aktivierungsmuster wie die nukleäre Translokation des *immediate Early* Genproduktes c-Fos, eines klassischen Transkriptionsfaktors herangezogen (Patronats et al., 1998) und Review: (Kovacs, 1998) und physiologische Parameter wie Körpertemperatur, Lokomotion und Futter-/Wasseraufnahme anhand eines telemetrischen Systems aufgezeichnet. Zur Aufzeichnung von Aktivität und Temperatur wurden den Tieren entsprechende Sender in die Bauchhöhle sowie zur i.c.v. Applikation in einen der Lateralventrikel des Gehirns Mikro-Injektionskanülen stereotaktisch implantiert.

3.1 Implantation von i.c.v. Kanüle und Telemetriesender

Für die Untersuchung der modulatorischen Wirkung von PyrAp13 auf LPS-induzierte Parameter wurden männliche Wistar Ratten mit einem Anfangsgewicht von 180-280 g und die Analyse der circadianen Rhythmik physiologischer Zielgrößen Tieren mit einem Körpergewicht von 200-240 g eingesetzt. Für den Versuch zur apelinergen Modulation der AngII-induzierten Trinkantwort kamen Tiere mit einem Gewicht von 210 - 290 g zum Einsatz. Einen Tag vor dem operativen Eingriff wurden die Tiere aus der Gruppenhaltung der Zuchtkolonie in Typ IV Polycarbonatkäfigen einzeln mit Futter und Wasser *ad libitum* in Polycarbonatkäfige (Typ III) bei einer Umgebungstemperatur von 23 °C umgesetzt. Dies geschah, um die Stressbelastung direkt vor der Operation zu minimieren. Vor dem Eingriff wurde jedem Tier zur Analgesie 2,25 mg/kg Metacam subcutan (s.c.) in einem Volumen von 0,1 ml injiziert und direkt darauffolgend mit der intraperitonealen (i.p.) Verabreichung einer Mischung aus Cepetor (330 µg/kg) und Ketaminhydrochlorid (80 mg/kg) die Narkose eingeleitet. Bis zum Eintritt der Narkose wurde der Käfig abgedeckt stehen gelassen und 5-10 min danach das Tier aus dem Käfig entnommen. Für die Implantation der i.c.v. Kanüle wurden anhand eines Schergerätes die Fellhaare der Kopfhaut, beginnend kurz über

Augenhöhe, bis zu den Ohren geschoren. Für die Implantation der Telemetriesender in die Bauchhöhle wurde zusätzlich ein 40 x 40 mm große Fläche im Bereich der *Linea alba* des Abdomens rasiert. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung während der OP wurden diese mit einem speziellen Augengel behandelt.

Für die *in vivo* Untersuchungen an der Ratte wurde zur Implantation des i.c.v. Mikrokanülensystems ein stereotaktischer Rahmen benötigt. Dieser ermöglichte sowohl eine sichere und stabile Fixierung des Kopfes während der operativen Eingriffs als auch die exakte Implantation der i.c.v. Kanüle. Das zu operierende Tier wurde deshalb in einem stereotaktischen Rahmen im Bereich der äußeren Gehörgänge mittels *ear bars* sowie am Oberkiefer fixiert. Zum Schutz vor narkosebedingter Hypothermie erfolgte der operative Eingriff auf einer Wärmematte mit Regulierungselement zur Konstanthaltung der Körperkerntemperatur. Um Infektionen der Operationswunden vorzubeugen, wurden alle verwendeten Instrumente zuvor autoklaviert oder es wurde entsprechend steriles Einmalbesteck benutzt. Zu Beginn wurde die rasierte Stelle der Kopfhaut des Schädels mit Cutasept® desinfiziert und zusammen mit der Unterhaut mit einem Einmalskalpell median rostro-caudal auf einer Länge von circa 30 mm eröffnet. Anhand der Skalpellschneideklinge wurde der Knochen der Schädeldecke freigelegt und die Wunde mit Wundspannern lateral erweitert. Darauf folgend wurde eine H₂O₂-Lösung (30 %) aufgetragen, um die Schädeldecke zu reinigen und eventuell vorhandene Blutungen zu stillen. Dadurch wurden auch die Kreuzungspunkte der Knochennähte *Sutura lambdoidea* (Lamda) und Bregma sichtbar, welche als Orientierungspunkte auf der Schädeldecke dienten. Mit einem Dentalbohrer wurden in ausreichendem Abstand von der für die i.c.v. Kanüle vorgesehenen Position vier Löcher gebohrt, in welche Knochenschrauben (1,5 x 3,2 mm) zur späteren Fixierung des Zements eingesetzt wurden. Für die i.c.v. Führungskanüle wurde 0,8 mm caudal und 1,5 mm lateral - beziehungsweise auf das Bregma - ebenfalls ein Loch in die Schädeldecke gebohrt (*Abbildung 15A*). Mit der Spitze einer sterilen Injektionskanüle wurden vorsichtig die *Dura mater* durchstoßen. Danach konnte die i.c.v. Kanüle in die vorgebohrte Schädelöffnung 2,5 mm tief von der Oberfläche des Schädels abgesenkt werden (*Abbildung 15B*). Nach Reinigung der Schädelkalotte wurde mit einem Spatel der noch flüssige Zahnzement auf die Schädeldecke um die abgesenkte i.c.v. Kanüle und die Halteschrauben herum aufgebracht. Zusätzlich wurden die Wundränder versiegelt. Nach der Polymerisation des Zahnzements wurde eine Dummykanüle zum Schutz vor Schmutz und Keimen in die i.c.v. Kanüle

eingesetzt. Zum Abschluss wurde den Tieren zum Ausgleich für etwaige Flüssigkeitsverluste durch den Eingriff 1,0 ml sterile Kochsalzlösung s.c. injiziert.

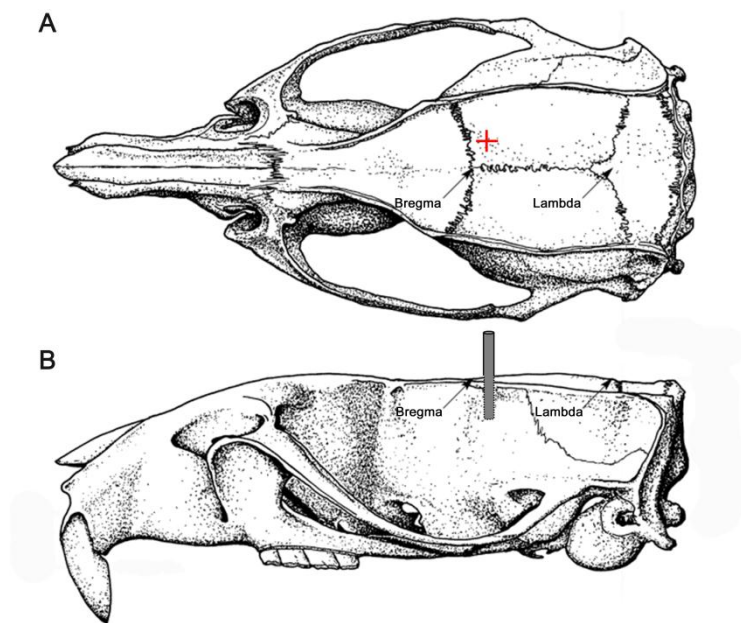


Abbildung 15: Aufsicht (A) und laterale (B) Ansicht des Rattenschädels mit Markierung (rot) für die Platzierung der Kanüle zur intracerebroventrikulären Injektion (grau). Die für die Operation verwendeten Orientierungspunkte Bregma als Treffpunkt von Sutura coronalis und Sutura sagittalis und Lambda als Treffpunkt von Sutura sagittalis und Sutura lambdoidalis sind mit Pfeilen dargestellt (Paxinos und Watson, 2005).

Anschließend wurde die Ratte aus dem stereotaktischen Rahmen entfernt, auf eine weitere Wärmematte transferiert und die rasierte Stelle am Bauch ebenfalls desinfiziert. Mit einem Skalpell wurde die Haut im Bereich der *Linea alba* über 25 mm eröffnet und durch Stichinzision mit einer feinen Schere die Muskelschicht und das Peritoneum längs der *Linia alba* durchtrennt. Nach Implantation des zuvor kurzzeitig in 70 % Ethanol desinfizierten Senders in die Bauchhöhle wurden die Wundränder an der Muskelschicht mittels resorbierbaren Nahtmaterials durch Diagonalhefte verschlossen. An der darüber liegenden Hautschicht wurde nicht resorbierbares Nahtmaterial und Einzelhefte verwendet, um die Wunde zu verschließen. Abschließend wurde die so entstandene Wundnaht mit Braunol zur Desinfektion und besseren Wundheilung betupft und die Tiere zurück in den Käfig mit frischer Einstreu auf ein Stück Zellstoff platziert. Zur Antagonisierung der Narkose wurden 1,25 mg/kg Anti-Sedan in einem Volumen von 0,05 ml intramuskulär (i.m.) injiziert.

Während des Aufwachvorgangs befanden sich die Käfige auf Wärmematten und die Tiere waren unter ständiger postoperativer Beobachtung. Zur weiterführenden Analgesie wurde 24 Std. postoperativ 1,13 mg/kg Metacam s.c. verabreicht. Gleichzeitig wurden auch die Wundnähte, das Gewicht und das Verhalten der Tiere auf Auffälligkeiten hin überprüft.

An den darauffolgenden Tagen bis zum Versuchsbeginn wurden die Tiere täglich für einige min an eine Einschränkung der Bewegungsfreiheit zur stressfreien Gewöhnung an die spätere Durchführung der i.c.v. Injektionen gewöhnt (= *handling*). Dies geschah, um später eine Stressreaktion der Tiere durch die Injektionssituation zu minimieren. Zusätzlich wurden weiterhin alle zuvor genannten Parameter überwacht, um bei allen Tieren einen erfolgreichen Heilungsprozess zu gewährleisten.

3.2 Intracerebroventrikuläre Mikroapplikationen

3.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) pH 7,4

125 mmol/l	NaCl	7,3	g/l
2,5 mmol/l	KCl	0,19	g/l
1,25 mmol/l	NaH ₂ PO ₄	0,17	g/l
26 mmol/l	NaHCO ₃	2,18	g/l
2 mmol/l	CaCl ₂	0,294	g/l
1 mmol/l	MgCl ₂	0,203	g/l
25 mmol/l	Glucose	4,95	g/l

3.2.2 Methode

Für die Durchführung der i.c.v. Mikroapplikationen wurden die Tiere, wie oben erwähnt, durch *handling* über einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen an das Prozedere der Injektion gewöhnt. Zur Ausführung der i.c.v. Mikroinjektionen (2 µl Volumen) kamen speziell angefertigte, über die Führungskanüle hinausragende Injektionskanülen mit 2,0 mm Projektion über die Führungskanüle hinaus zur Anwendung. Zum Zwecke der Injektion wurden diese über einen 15 cm langen Polypropylenschlauch (PP20, 26G) mit einer

Hamiltonspritze (10 µl) verbunden. Das Schlauchstück wurde vor jeder Benutzung mit 70% Ethanol desinfiziert und mit sterilem aCSF gewaschen. Anschließend wurde es mit aCSF gefüllt und unmittelbar vor der Injektion die zu injizierenden Substanzen aufgenommen.

Alle i.c.v. zu verabreichenden Substanzen wurden in Aliquots bei -50 °C gelagert, unmittelbar vor der Injektion aufgetaut und jeweils ein Volumen von 2 µl über eine Zeit von 30 sec i.c.v. appliziert. Dazu wurden die Tiere, wie zuvor durch *handling* trainiert, in einem Handtuch mit einer Hand an der Schulter restringiert. Anschließend wurde die Schutzkappe mit Dummykanüle aus der i.c.v. Führungskanüle entfernt und die Injektionskanüle in die i.c.v. Führungskanüle eingeführt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Applikation diente dabei die Bewegung einer kleinen Luftblase innerhalb des Schlauches. Diese befand sich an dem Schlauchende, an welchem die Injektionskanüle angeschlossen war, und wurde vor der Aufnahme der zu applizierenden Substanzen erzeugt. Anschließend verblieb die Injektionskanüle für weitere 30 sec in der Führungskanüle, um einem möglichen Rückstrom der injizierten Lösungen in die Injektionskanüle vorzubeugen. Danach wurde die Führungskanüle wieder mit der Dummykanüle mit Schutzkappe verschlossen und das Tier zurück in seinen Käfig gesetzt. Während der verschiedenen Versuche wurden folgende Substanzen i.c.v. in jeweils 2 µl Volumen appliziert: aCSF, PyrAp13 (20 nmol), Angiotensin II (40 ng $\hat{=}$ 40 pmol), Angiotensin II (40 pmol) + PyrAp13 (20 nmol).

3.3 Telemetrie

3.3.1 Der Sender

Zur Aufzeichnung der Körperkerntemperatur und der lokomotorischen Aktivität wurden telemetrische Sender des Typs VM-FH TR-3000 für Ratten und Mäuse verwendet, wobei sich die Elektronik des Senders in zwei ineinander gesteckten, zylinderförmigen Plastikhülsen (15 x 10 mm) befand. Zum Schutz vor peritonealer Flüssigkeit wurden diese zusätzlich in Paraffin eingebettet. Dazu wurde dieses zunächst im Wärmeschrank durch Erhitzen auf 70 °C zum Schmelzen gebracht. Anschließend wurde der Sender durch Eintauchen an einem Faden mit der wieder erkaltenden Masse umhüllt. Mit einem leicht erhitzten Stück Metalldraht wurden

möglicherweise entstandene, scharfe Kanten auf der Oberfläche des Paraffins geglättet. Für die Energieversorgung des Senders sorgte eine Knopf-batterie-zelle. Die Implantation der Sender in die Bauchhöhle erfolgte, wie oben beschrieben, zusammen mit der i.c.v.-Kanülen.

Das Messprinzip besteht darin, dass eine Änderung der Körpertemperatur des Tieres und somit der Umgebungstemperatur des Senders dazu führt, dass dieser Sender spezifisch, mit einer für ihn charakteristischen linearen Änderung der gesendeten Frequenz reagiert. Das zur Aufzeichnung der Daten verwendete Computerprogramm (Vital View, Version 3.1) konnte anhand der zuvor für jeden einzelnen Sender bei $37,0 \pm 0,1$ °C und $41,0 \pm 0,1$ °C ermittelten Referenzfrequenzen die realen Körperkerntemperaturen auf 0,1 °C genau bestimmen. Die Ermittlung der lokomotorischen Aktivität erfolgte über die Bewegung eines im Sender enthaltenen Trägheitsmoments, dessen produziertes Signal in Abhängigkeit von Entfernung und Ausrichtung zur Empfängerplatte variierte.

3.3.2 Die telemetrische Versuchsanordnung

Alle telemetrischen Aufzeichnungen wurden in einer digital gesteuerten Klimakammer für kleine Versuchstiere bei einer Raumtemperatur von 23 ± 1 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einer Beleuchtungszeit von 12:12 Stunden (7:00-19:00 Uhr) durchgeführt. Zur Messung der physiologischen Parameter Körperkerntemperatur, Aktivität, Wasser- und Futteraufnahme pro Tier war die Klimakammer mit sechs Messplätzen ausgestattet.

Am Ende der 7-tägigen, überwachten Erholungsphase nach dem operativen Eingriff (Telemetriesender + i.c.v.-Kanüle) wurden die Tiere einzeln in die Versuchskäfige (30 x 22,5 x 24 cm; L x H x B) aus transparentem Plexiglas umgesetzt. Der Boden jedes Käfigs war 2-3 cm hoch mit Einstreu ausgelegt, welches alle drei Tage ausgetauscht wurde und der Deckel enthielt zahlreiche Löcher für den Luftaustausch. Über einen kurzen, tunnelförmigen Übergang an der Seite des Käfigs hatten die Tiere uneingeschränkten Zugang zu gemahlenem Futter (*Abbildung 16*). Wasser konnte, ebenfalls an derselben Seite, über eine Nippeltränke aufgenommen werden, welche über einen Schlauch mit einer, in einer Halterung befindlichen, Wasserflasche in Verbindung stand.

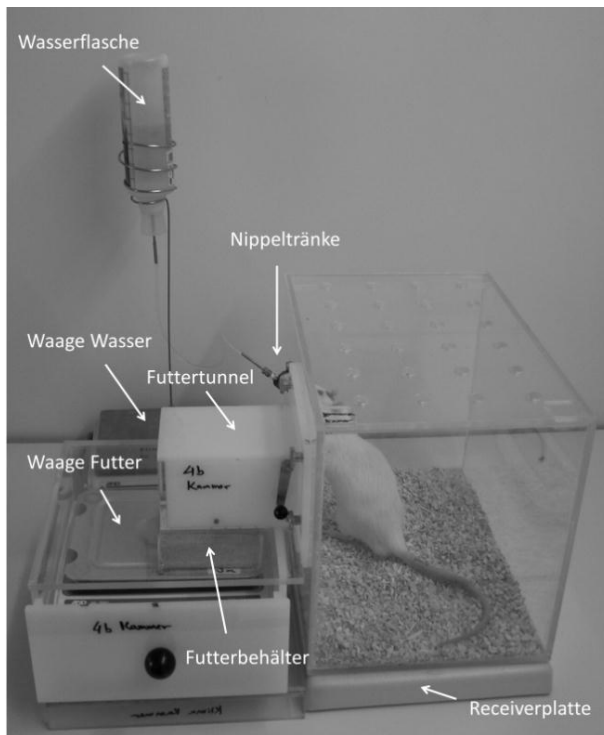


Abbildung 16: Aufbau der telemetrischen Versuchsanordnung zur Aufzeichnung von Körperkerntemperatur, Futter- und Wasseraufnahme sowie lokomotorischer Aktivität.

Zur Messung von Körperkerntemperatur und Aktivität diente ein der Ratte implantierter Sender. Dessen Signale wurden anhand einer unter dem Käfig befindlichen Receiverplatte über einen Dataport an einen Computer übermittelt und aufgezeichnet. Zusätzlich befanden sich die Behälter für Futter und Wasser auf ebenfalls an den Computer angeschlossenen Differenzialwaagen. Die Aufzeichnung von Futter-/Wasseraufnahme und Aktivität erfolgte kumulativ für jeweils 5 min. Die Körperkerntemperatur wurde ebenfalls jeweils alle 5 min aufgezeichnet.

Futter und Trinkwasser standen den Tieren, falls nicht anders erwähnt, während allen Versuchen *ad libitum* zur Verfügung und wurden jeden Morgen aufgefüllt bzw. erneuert. Sowohl der Futterbehälter als auch die Wasserflasche mit ihrer jeweiligen Halterung befanden sich auf Differenzialwaagen, mit einer Messgenauigkeit von 0,01 g (Abbildung 16), welche über je einen Dataport mit einem Computer verbunden waren. Somit konnte die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere kontinuierlich alle 5 min aufgezeichnet werden.

Unterhalb des Käfigs befand sich eine Empfängerplatte, an welche die gesendeten Frequenzen des in der Bauchhöhle befindlichen Senders der Ratte übertragen wurden. Über den jeweiligen Dataport fand eine Weiterleitung dieser Informationen ebenfalls an den Computer statt. Anhand der Referenzfrequenzen jedes Senders konnte durch das Programm „Vital View“ die aktuelle Körperkerntemperatur in °C ermittelt und aufgezeichnet werden. Auch die Bewegungsaktivität der Tiere wurde über dieses Programm einheitenfrei alle als „Aktivitätscounts“ dokumentiert. Die Aufnahme von Futter und Wasser wurde mittels kumulativer Differenzialwägung durch das Programm „AccuDiet“ erfasst. Alle vier Parameter wurden über den gesamten Messzeitraum alle 5 min aufgezeichnet. Die Körperkerntemperatur wurde dabei jeweils als Einzelmessung, die drei anderen Parameter hingegen als kumulative Messung dieses Zeitraumes aufgezeichnet. Der Gewichtsstatus der Tiere wurde täglich durch Wiegen überprüft und dokumentiert.

3.4 Studiendesign einzelner Experimente

3.4.1 Verifizierung der korrekten Platzierung der i.c.v. Kanüle

Sechs Tage nach dem operativen Eingriff wurde ein sogenannter Trinktest zur Verifikation der korrekten Platzierung der i.c.v. Kanüle durchgeführt. Dazu wurden 40 pmol (40 ng) AngII, gelöst in 2 µl aCSF, über die Kanüle, wie in Kap. 3.2.2 beschrieben, appliziert. Dies löste bei korrekter Platzierung und der daraus resultierenden Applikation in den lateralen Ventrikel einen starken Trinkreiz bei den Tieren aus. Deshalb wurde nach dem Zurücksetzen der Ratten in die Käfige diese Trinkantwort über einen Zeitraum von 30 min durch die telemetrische Aufzeichnung (Kap. 3.4.2 und 3.4.4) oder durch manuelles Wiegen der Trinkflaschen (Kap.3.4.3) erfasst. Nur Tiere, die in diesem Zeitraum mindestens 9,0 ml tranken, wurden in die *in vivo* Studien aufgenommen.

3.4.2 Einfluss von i.c.v. PyrAp13 auf Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Parameter des sickness behavior

Ziel dieses Versuches war die Untersuchung eines möglicherweise modulatorischen Einflusses von zentral (i.c.v.) appliziertem PyrAp13 auf durch systemische LPS-Applikation induzierte, zentrale Komponenten des *sickness behavior* wie Fieber, eingeschränkte Lokomotion, Hypophagie und Hypodipsie. Dafür wurden männliche Ratten mit einem Anfangsgewicht von 180-280 g verwendet. Aufgrund der räumlichen Beschränkung mit nur sechs telemetrischen Messplätzen in der Klimakammer erfolgte die Durchführung des Experiments in vier Gruppen à sechs sowie zwei Gruppen à vier Tieren.

Zu Beginn des Versuchs wurden die Versuchstiere mit einer i.c.v. Kanüle und einem telemetrischen Sender (i.p.) versehen. Während der darauffolgenden 9-10 tägigen Vorlaufphase wurde täglich das Körpergewicht des Versuchstiers aufgezeichnet (Abbildung 17), sowie zur Gewöhnung an die i.c.v. Mikroapplikation (= *handling*) täglich eine kurzzeitige Bewegungsrestriktion für 2 min in einem Handtuch mit einer kurzen Abnahme der Dummykanüle durchgeführt. Dieses *handling* des Tieres sollte auf die spätere Injektionssituation vorbereiten, um dann eine Stressreaktion zu minimierten.

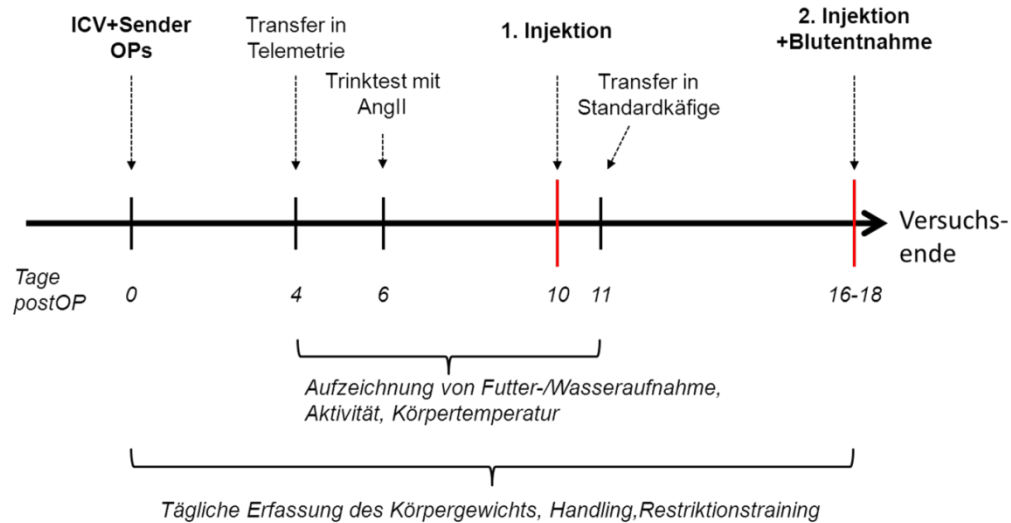


Abbildung 17: Graphische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs (= Tage postOP) der LPS/PyrAp13-Studie nach der Implantation von Temperatursender (i.p.) und intracerebroventrikulären (i.c.v.) Kanülen.

Nach der ersten i.c.v. Mikroinjektion PyrAp13 (20 nmol) verblieben die für Tiere 24 Std. in der telemetrischen Messanlage. Anschließend wurden sie in normale Käfige überführt und verblieben dort bis zur zweiten i.c.v. Mikroinjektion. Die Blutentnahme nach der 2. Injektion erfolgte nach entsprechender Narkotisierung der Tiere durch Herzpunktion. AngII= Angiotensin II (40 pmol)

Nach einer postoperativen Erholungsphase von vier Tagen wurden die Versuchstiere in die telemetrischen Käfige der Klimakammer überführt, um sich an die Begebenheiten der telemetrischen Anlage zu gewöhnen. Ab diesem Zeitpunkt wurde mit der Aufzeichnung der Futter-/Wasseraufnahme, der Aktivität und der Körperkerntemperatur begonnen und am Tag sechs *post operationem* (= post OP) der unter kap.3.4.1 beschriebene Trinktest durchgeführt.

Am Tag neun bzw. zehn *post operationem* nach den OPs wurden die ersten i.c.v. Injektionen einer Versuchsgruppe (n= 4-6) vorgenommen. Hierfür wurden zwei Apelin-Applikationsgruppen (Gruppen 1+2) und zwei entsprechende Kontrollgruppen (Gruppen 3+4) gebildet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Applikationen der vier verschiedenen Versuchsgruppen der LPS/PyrAp13-Studie.

Intracerebroventrikulär (i.c.v.) mikroappliziertes PyrAp13 (20 nmol) in künstlicher Liquorflüssigkeit (aCSF) bzw. aCSF alleine wurden in einem Volumen von 2 µl, intraperitoneal (i.p.) verabreichtes Lipopolysaccharid (LPS) in einer Dosis von 100µg/kg Körpergewicht in PBS bzw. PBS alleine in einem Volumen von 1ml injiziert.

Gruppe	i.c.v. Applikation	i.p. Applikation
1	PyrAp13	LPS
2	PyrAp13	PBS
3	aCSF	LPS
4	aCSF	PBS

Die Injektionen erfolgten in einem Zeitraum von 10:30-11:30 Uhr vormittags, wobei bei jedem Tier zuerst die intracerebroventrikuläre (i.c.v.; 2 µl) Mikroapplikation von PyrAp13 bzw. aCSF und danach die intraperitoneale (i.p.; 1 ml) Injektion von LPS (100µg/kg) bzw. PBS durchgeführt wurden. Nach dem Zurücksetzen der Tiere wurden alle telemetrischen Parameter für 24 Std. aufgezeichnet. Danach wurden die Tiere zurück in normale Standard-Rattenkäfige mit dem entsprechenden Futter- und Wasserangebot transferiert, in welchen sie bis zum Versuchsende verblieben. Eine zweite Versuchsapplikation erfolgte 6-7 Tage nach der ersten Injektion, wobei jedoch jedes Tier einer anderen Gruppe als zuvor zugeteilt wurde. Dies geschah, um möglicherweise auftretende Effekte anhand der repetitive Applikation der gleichen Substanz im gleichen Versuchstier vorzubeugen. Zwei Std. nach kombinierter i.p./i.c.v. Applikation (Tabelle 3) wurden die Ratten mit 180 mg/kg Körpergewicht Narcoren (i.p.) in tiefe Narkose versetzt, der Brustkorb eröffnet und 4-5 ml Blut mittels vorgekühlter Spritzen, welche 5000 I.U. Heparin, enthielten direkt aus dem Herzen entnommen. Anschließend wurden die heparinisierten Blutproben in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur Entnahme aller Proben auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Blutproben bei 2500 U/min für 10 min zentrifugiert, das überständige Plasma vorsichtig abgenommen und für die spätere Cytokinbestimmung bei -20 °C eingefroren (siehe Kap. 8).

3.4.3 Einfluss von i.c.v. PyrAp13 auf AngII-induziertes Trinkverhalten und Induktion der nukleären c-Fos Translokation

In diesem Versuch sollte ein möglicher modulatorischer Effekt von i.c.v. appliziertem PyrAp13 auf die ebenfalls durch zentral appliziertes AngII hervorgerufene Trinkantwort sowie zellulär nukleäre c-Fos-Translokation in Kerngebieten wie PVN, MnPO, SON und SCN untersucht werden. Dazu wurden männliche Ratten mit einem Gewicht von 210-290 g verwendet. Für den gesamten Versuchsteil wurden die Tiere in Standardkäfigen mit *ad libitum* Zugang zu Futter und Trinkwasser gehalten. Die Durchführung des Experiments erfolgte in vier Gruppen mit jeweils sechs Versuchstieren.

Vor Beginn der Versuche bekamen die Ratten die i.c.v. Kanüle implantiert und an allen darauffolgenden Tagen wurde täglich das Körpergewicht der Versuchstiere aufgezeichnet und eine Bewegungsrestriktion als Vorbereitung auf die Mikroapplikation durchgeführt (*siehe Kap. 3.4.2*). Nach einer postoperativen Erholungsphase von 5-6 Tagen wurden die Versuchstiere einer Versuchsgruppe (n=6) dem AngII-Trinktest unterzogen (*siehe Kap. 3.4.1*), um die korrekte Platzierung der Kanüle im Bereich des lateralen Ventrikels zu verifizieren. Da sich die Versuchstiere in diesem Versuch nicht in der telemetrischen Messanlage mit automatischer Registrierung von Futter- und Wasseraufnahme befanden, wurde die Wasserflasche jedes Tieres unmittelbar vor und 30 min nach der i.c.v. AngII-Mikroinjektion (40 pmol) gewogen. Acht bis neun Tage nach dem operativen Eingriff wurden schließlich die i.c.v. Injektionen vorgenommen. Dazu wurden drei unterschiedliche Behandlungsgruppen mit jeweils i.c.v. 1. AngII (40 pmol) alleine, 2. PyrAp13 (20 nmol) alleine, 3. AngII (40 pmol) und PyrAp13 (20 nmol) zusammen und 4. aCSF als Kontrolle gebildet. Alle Injektionen erfolgten in einem Volumen von 2 µl. Jeweils vor, sowie 30 und 90 min nach der erfolgten Injektion wurde die in diesem Zeitraum getrunkene Wassermenge durch Wägung der Wasserflasche bestimmt. Direkt nach Beendigung des Versuchs (90 min) wurden die Ratten mit Narcoren (200 mg/kg Körpergewicht) tief narkotisiert und transkardial mit einer 4 % PFA-Lösung perfundiert, das Gehirn entnommen und eingefroren (*siehe Kap. 4.1.1*). Von diesem Gewebe wurden Immunfluoreszenz-Markierungen für c-Fos und nNOS an coronalen Cryostat-Gefrierschnitten (20 µm) angefertigt. Dies erfolgte mit der Inkubationsplatten-Methode und zusätzlicher Biotinverstärkung (*siehe Kap. 4.2.2 und 4.3.3*).

Zur quantitativen Analyse der c-Fos-immunpositiven Neurone in den immunhistochemisch markierten Schnitten konnten je nach Verfügbarkeit für jedes Kerngebiet (PVN, MnPO, SCN,

SON) pro Region drei bis acht Fotografien (Vergrößerung 200x) pro Versuchstier verwendet werden. Eine Fotografie enthielt dabei die komplette Struktur (MnPO) oder eine der Hälften der paarig angeordneten Strukturen (PVN, SON, SCN). Bei größeren Strukturen wie MnPO oder PVN wurden zur Auszählung jeweils zwei Fotografien (Vergrößerung 200x) aneinandergefügt. Im PVN erfolgte die Auswertung nach einer weiteren Unterteilung in periventriculären, parvozellulären und magnozellanulären Bereich dieser Struktur. Für die Auszählung der c-Fos positiven Zellen der unterschiedlichen Regionen wurden in der Regel Aufnahmen aus jeweils unterschiedlichen Schnitten verwendet. War dies in einzelnen Fällen aufgrund der Beschädigung des Gewebes an den betreffenden Stellen nicht möglich, wurden jedoch auch beide Teile einer paarigen Struktur einzeln fotografiert und entsprechend für die Auszählung verwendet. Die Lage der fotografierten Region bezüglich der Injektionsseite wurde nicht berücksichtigt, da eine vorherige Untersuchung diesbezüglich keine Unterschiede ergab.

Alle für die Auswertung verwendeten Aufnahmen wurden manuell mittels des Programms Metamorph ausgezählt. Weiterhin wurde dabei überprüft, ob die betreffenden Zellen zusätzlich eine Co-Lokalisation mit nNOS aufwiesen. Für jedes Tier wurden die Mittelwerte aus allen entsprechend gezählten Schnitten pro Kerngebiet ermittelt. Aus diesen wurde dann innerhalb der verschiedenen Gruppen der entsprechende Gesamtmittelwert mit zugehörigem Standardfehler (S.E.M.) gebildet. Die statistische Evaluierung wurde anhand der Statistikfunktion des Programms Prism durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) und dem post-hoc Test Newman-Keuls durchgeführt. Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (AngII und AngII+PyrAp13) in der Anzahl der total c-Fos-positiven und der nNOS+c-Fos immunreaktiven Zellen zu den entsprechenden Kontrollgruppen PyrAp13 (*-**) und aCSF (#-##) wurden mit einem $p \leq 0,05$ (#/*) und $p \leq 0,01$ (##/**) als statistisch signifikant erachtet.

3.4.4 Einfluss von i.c.v. PyrAp13 auf die circadiane Rhythmik physiologischer Parameter

Ziel dieses Experiments war es zu untersuchen, in wie weit sich die zentrale i.c.v. Mikroapplikation von PyrAp13 auf die circadiane Rhythmik physiologischer Parameter wie Futter-/Wasseraufnahme, Aktivität oder Körperkerntemperatur auswirkt. Zusätzlich wurde

dies in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der PyrAp13-Stimulation untersucht. Für diesen Versuch wurden männliche Ratten mit einem Körpergewicht von 200-240 g herangezogen.

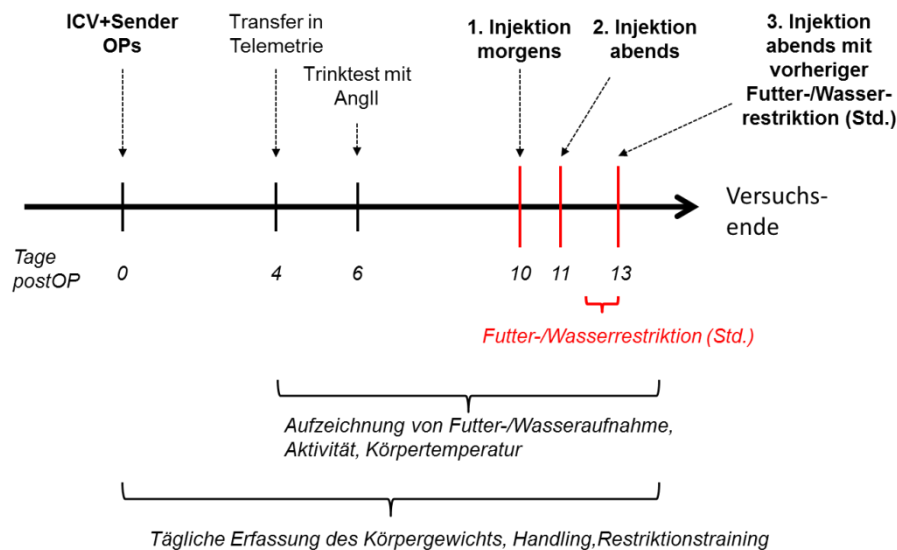


Abbildung 18: Graphische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs (= Tage postOP) der Studie zur Untersuchung der Beeinflussung circadianer physiologischer Rhythmen durch PyrAp13 nach der Implantation von Temperatursender und intracerebroventrikulär (i.c.v.) Kaniüle.

Alle Tiere erhielten entweder i.c.v. PyrAp13 (20 nmol) oder aCSF an drei hintereinander folgenden Injektionen. Die erste erfolgte dabei zehn Tage post-OP morgens zwischen 10:30 und 11:00 Uhr. 30-31 Std. danach wurde die zweite Behandlung ca. 30 min vor „lights out“ vorgenommen. Am darauffolgenden nächsten Abend wurde den Tieren für 24 Std. Futter und Wasser entzogen. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wurde die dritte Injektion vorgenommen, anschließend wieder Zugang zu Futter und Wasser gewährt und die Daten für weitere 24 Std. aufgezeichnet. AngII= Angiotensin II (40 pmol)

Den Versuchstieren wurden, wie in Kap. 3.1 beschrieben, i.c.v. Kanülen und Telemetriesender implantiert. Der Vorlauf bis zur ersten i.c.v. Mikroinjektion verlief wie bei Versuch 3.4.2 dargestellt (Abbildung 17). Die Versuchstiere wurden somit vier Tage *post operationem* in die Klimakammer mit der telemetrischen Messanlage transferiert. Zur Untersuchung der circadianen Rhythmik wurden nur zwei Behandlungsgruppen (i.c.v. jeweils 2 µl PyrAp13 (20 nmol) oder aCSF) benötigt. Dementsprechend wurde das Experiment mit lediglich zwei Versuchsgruppen zu jeweils sechs Tieren durchgeführt. Jedes Tier erhielt in den drei aufeinanderfolgenden Injektionen jeweils abwechselnd eine unterschiedliche Injektion und wechselte somit zu jeder Injektion die Behandlungsgruppe. Die erste Injektion

wurde morgens im Zeitraum zwischen 10:30 und 11:30 Uhr durchgeführt. Im Gegensatz dazu erfolgte die zweite Injektion 30-31 Std. nach der ersten im Zeitraum von 30 min vor *lights out* am Abend des nächsten Tages. Dies geschah, um einen unmittelbaren Einfluss der i.c.v. Verabreichung des Peptids auf die Aktivitätsphase der Tiere untersuchen zu können (*Abbildung 18*).

Nachdem alle Parameter im Zeitraum von 24 Std. nach dieser Injektion aufgezeichnet waren, wurde den Ratten für die nächsten 24 Std. der Zugang zu Futter und Wasser verwehrt. Dazu wurde der Zugang zum Futtertunnel verschlossen und der Wassernippel aus seiner Halterung im Käfig entfernt. Die Restriktion wurde durchgeführt, um die bei normaler Verabreichung möglicherweise zu geringe Effekte von PyrAp13 zu verstärken. Nach Ablauf dieser Zeit wurde erneut zum gleichen Zeitpunkt des Abends wie bei der vorherigen Injektion injiziert und anschließend wieder Zugang zu Futter und Wasser gewährt und die entsprechenden telemetrischen Daten für 24 Std. aufgezeichnet.

3.5 Datenevaluation von Futter-/Wasseraufnahme und telemetrischen Daten

Die im Verlauf der Versuche bei systemischer LPS/PBS Applikation (*Kap.3.4.2*) sowie in der Untersuchung zur circadianen Rhythmik physiologischer Parameter nach zentraler PyrAp13-Applikation (*Kap. 3.4.4*) aufgezeichneten Daten wurden zur Auswertung umgeformt. Dazu wurden sie als Differenz des Prozentsatzes der kumulativen Basalwerte von 24 Std. für die lokomotorische Aktivität und jeweils 6, 12 und 24 Std. für die Futter-/Wasseraufnahme jeder Versuchsgruppe dargestellt. Hierfür wurde für jedes Tier die Aufnahme von Futter und Wasser bzw. die lokomotorische Aktivität jeweils zur gleichen Tageszeit und Dauer einen und fünf Tage vor Versuchsbeginn bestimmt und die so gewonnenen Daten der beiden Tage gemittelt. Zu diesen jeweiligen Basalwerten (100 %) wurde für jedes Tier der prozentuale Anteil nach der Injektion ermittelt und anschließend der Deltawert als Differenz von 100 % verwendet. Aus diesen Deltawerten jedes einzelnen Tieres wurde für jede Behandlungsgruppe der entsprechende Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler (S.E.M.) errechnet. Zur Bestimmung der Basalwerte für Aktivität, Futter- und Wasseraufnahme wurden jeweils zwei Vorlaufstage gemittelt um möglicherweise auftretende Fehler bedingt durch individuelle Schwankungen der Daten innerhalb nur eines Tages zu minimieren.

Zur Darstellung der Körperkerntemperatur des LPS-Versuchs wurden ebenfalls Deltawerte verwendet. Als Basalwert für diesen Parameter diente das Mittel aller Datenpunkte aus 24 Std. zwei Tage vor der jeweiligen i.c.v. Mikroinjektion. Alle Datenpunkte nach den jeweiligen Injektionen wurden dementsprechend für jedes Tier als Deltawerte zu diesem entsprechenden jeweiligen Basalwert berechnet, für die einzelnen Versuchsgruppen gemittelt und der zugehörige Standardfehler (S.E.M.) errechnet. Zur statistischen Evaluierung, wurden die Deltawerte jedes Tieres über den Zeitraum von jeweils drei Std. gemittelt und in den jeweiligen Versuchsgruppen aus den so aufgearbeiteten Daten die endgültigen Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler (S.E.M.) errechnet. Die Errechnung von Deltawerten der Körpertemperatur in Bezug zu einem Basalwert erwies sich als notwendig, da einige der zur Messung verwendeten Sender Temperatursprünge von $\pm 1-2^\circ$ in ihren absoluten Werten aufwiesen, was eine direkte Auswertung der Daten erheblich erschwert hätte. Als Basalwert wurde der Mittelwert aus 24 Std. gewählt, weil die Evaluierung der Körperkerntemperatur nach der Injektion über einen längeren Zeitpunkt (15 Std.) ebenfalls zu gleichen Teilen Fluktuationen während der Tag- und Nachtphase der Tiere beinhaltete. Dies wäre bei der Ermittlung des Basalwertes aus einer Zeitspanne unmittelbar vor den Injektionen nicht der Fall gewesen.

Die statistische Evaluierung wurde für die Parameter der lokomotorischen Aktivität und der Futter-/Wasseraufnahme anhand der Statistikfunktion des Programms Prism durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) und dem post-hoc Test Newman-Keuls durchgeführt. Für die 3Std.-Werte der Temperaturdaten erfolgte die Analyse mit einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse (Two-way ANOVA) ebenfalls mit dem post-hoc Test Newman-Keuls. Für alle Analysen wurde ein minimales Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ verwendet.

4. Immunhisto- und -cytochemische Untersuchungen

Sowohl für den immunhistochemischen Nachweis spezifischer Antigene in coronalen Gefrierschnitten des Rattengehirns als auch den immuncytochemischen Nachweis spezifischer Antigene in Zellen der verschiedenen Primärkulturen (PVN, MnPO, ARC, HZL) wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Hierbei bindet zunächst ein

primärer Antikörper an die jeweilige Antigenstruktur. Je nach Spezies des „Hosts“ für diesen Antikörper (z.B. Kaninchen oder Maus) wird ein entsprechender Sekundärantikörper verwendet, welcher in einer anderen Tierspezies generiert wird und gegen die Fc-Komponente des Primärantikörpers gerichtet ist. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Fluorophor (z.B. Cy3 oder Alexa488) gekoppelt. Da pro IgG-Molekül des Primärantikörpers mehrere IgG-Moleküle des Sekundärantikörpers binden können, ergibt sich eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals (Coons und Kaplan, 1950) (*Abbildung 19A*).

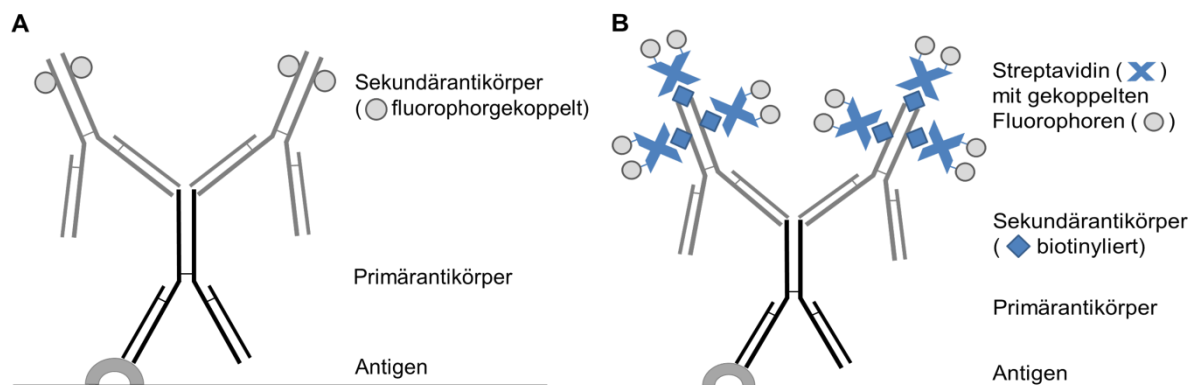


Abbildung 19: Prinzip der regulären indirekten Immunfluoreszenz mit dem antigenbindenden Primärantikörper und fluorophorgekoppeltem Sekundärantikörper (A) und der Verstärkung des Signals durch (B) einen biotinylierten Sekundärantikörper mit anschließender Bindung des mehrfach fluorophorgekoppelten Streptavidins.

Erweist sich dieser Verstärkungseffekt als nicht ausreichend, so kann mit der Verwendung der Avidin-Biotin-Methode (*Abbildung 19B*) eine weitere Amplifizierung des Fluoreszenzsignals erreicht werden. Hierfür nutzt man die hohe Affinität des Proteins Streptavidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* zu Vitamin H (= Biotin) ($K_d = 10^{-15}$ mol/l bei pH 5) (Green, 1963). Nach Bindung des Primärantikörpers an die Antigenstruktur wird dabei ein Sekundärantikörper mit zahlreichen, kovalent gebundenen Biotinmolekülen eingesetzt. Anschließend kann das mit mehreren Fluorophormolekülen gekoppelte tetramere Streptavidin an die Biotinmoleküle des Sekundärantikörpers binden (*Abbildung 19B*). Durch die mehrfache Konjugation mit dem Fluorophor kommt es dann, verglichen mit der regulären indirekten Immunfluoreszenz, zu einer zusätzlichen Amplifizierung des Fluoreszenzsignals.

4.1 Gewebepvorbereitung für die Immunhistochemie

Für die Durchführung immunhistochemischer Untersuchungen am Gehirngewebe der Ratte stellen eine optimale Antigenfixierung sowie Schnittpräparation unabdingbare Grundvoraussetzungen dar.

4.1.1 Transkardiale Perfusion

4.1.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- Phosphatgepufferte Saline (PBS)
- Heparinisierte isotonische Kochsalzlösung (NaCl) (0,9 %)

0,15 mol/l	NaCl in entionisiertem Wasser
10 I.U. /ml	Heparin
- Saccharoselösung (20 % Vol.)

0,58 mol/l	Saccharose in PBS
------------	-------------------
- Paraformaldehydlösung (PFA), 4 %

Herstellung: Aufgrund der gesundheitsschädlichen und möglicherweise auch kanzerogenen Eigenschaften von Paraformaldehyd (PFA) wurden alle Herstellungsschritte der PFA-Lösung unter dem Abzug und mit entsprechender Schutzkleidung durchgeführt. Zur Herstellung der Lösung wurden 40 g des Paraformaldehyds in 1 l PBS unter Rühren kontrolliert auf einer Heizplatte bei 60-62 °C gelöst, bis sie klar und durchsichtig wurde. Dies konnte auch vorzeitig durch die Zugabe von einigen Tropfen 2N NaOH erreicht werden. Anschließend wurde der pH-Wert des PFAs mittels NaOH oder HCl auf 7,3 eingestellt, die Lösung durch einen Faltenfilter abfiltriert und auf Eis abgekühlt. Vor jeder transkardialen Perfusion wurde die 4 % PFA-Lösung immer frisch angesetzt, um die Bildung von Polymerisaten zu minimieren. Für die Fixierung von Zellkulturen zur anschließenden immuncytochemischen Markierung wurde die gekühlte (4 °C) Lösung andererseits zwei Wochen lang verwendet.

4.1.1.2 Durchführung

Um die entsprechenden Zielantigene der für die immunhistologischen Markierungen verwendeten Antikörper in neuroglialen Strukturen des Hypothalamus sowie anderer Hirnareale zu konservieren, wurde durch eine transkardiale Perfusion mit 4 % PFA-Lösung eine Fixierung des Gehirns *in vivo* vorgenommen. Diese Behandlung erzeugt eine temperatur- und pH-abhängige Quervernetzung einzelner Proteinstrukturen untereinander sowie mit Nukleinsäuren, was hauptsächlich durch die Ausbildung von inter- und intramolekularen Methylenbrücken geschieht (Auerbach et al., 1977).

Unmittelbar vor der transkardialen Perfusion wurde das jeweilige Versuchstier mit 200 mg/kg Narcoren durch intraperitoneale (i.p.) Verabreichung tief narkotisiert, und nach Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes in Rückenlage auf einem Präparationsgitter mit darunter platzierter Ablaufwanne an allen vier Extremitäten durch Klebeband unter dem Abzug fixiert. Zur Durchführung der transkardialen Perfusion wurde zunächst mit einer Schere die Bauchdecke der Ratte caudal des Thorax eröffnet. Mit einem Nadelhalter wurde der Schwertfortsatz des *Sternum* fixiert und leicht angehoben. Der Thorax wurde lateral in cranialer Richtung so weit wie möglich eröffnet, ohne das Perikard dabei zu verletzen. Nach vollendeter Eröffnung auf beiden Seiten konnte der gesamte Brustkorb mithilfe des Nadelhalters nach cranial geöffnet werden, wodurch das Herz frei zu liegen kam.

Die Perfusionskanüle (0,8 mm Außendurchmesser) wurde in den linken Herzventrikel eingestochen und dort während der gesamten Prozedur belassen. Sofort darauf wurde der rechte Vorhof mittels Stichinzision durch eine kleine Schere eröffnet. Anschließend wurde das gesamte Körper-Kreislaufsystem des Tieres mit 4 °C kalter und heparinisierter isotoner NaCl-Lösung blutfrei gespült (20-40 sec). Während des gesamten Perfusionsvorgangs wurde mittels einer angeschlossenen Fußpumpe ein konstanter Druck von ca. 100 mmHg, welcher dem arteriellen Mitteldruck der Ratte entspricht (Stal'nenko et al., 1969), im System aufrecht erhalten. Durch die Betätigung eines Dreiwegehahns konnte, bei gleichbleibendem Druck, nach erfolgter Ausblutung auf die Einleitung des ebenfalls 4 °C kalten PFA umgeschaltet werden. Für die vollständige transkardiale Perfusion eines Tieres wurden jeweils 300 ml an heparinisierter NaCl-Lösung sowie PFA verwendet.

Zur raschen Präparation des Gehirns wurde nach vollendeter Fixierung des Tieres zunächst der Kopf vom Rumpf des Tieres abgetrennt, die Nacken- und Halsmuskulatur entfernt und

mit einer Schere oder einem Skalpell die Kopfhaut caudocranial aufgeschnitten. Beginnend am *Foramen magnum* wurde die Schädeldecke vorsichtig mit einer Hohlmeißelschere ebenfalls caudo-rostral bis auf Höhe des *Bulbus olfactorius* komplett abgetragen und dieser anschließend am Übergang zu den Riechnerven mit einer kleinen Schere durchtrennt. Vor der Entnahme des Gehirns wurden zunächst eventuell noch vorhandene Anteile der *Dura mater* entfernt. Durch anschließende Drehung des Kopfes um 180° konnte das Gehirn mit leichtem Druck der Scherenseite auf die eben durchtrennte Stelle um circa 30° nach unten aus dem Schädel gekippt werden. Dabei war darauf zu achten, ein Abreißen der *Nervi optici* durch die erhöhte Spannung und damit eine mögliche Beschädigung rostro-basaler Komponenten des Hypothalamus, wie etwa des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), zu vermeiden. Nach Durchtrennung der Sehnerven konnte das Gehirn vollständig intakt aus dem Schädel entnommen werden.

Das so präparierte Gehirn wurde durch Skalpell-Schnitte rostral der *Lamina terminalis* und auf Höhe des anterioren *Cerebellum* in 4 °C PFA für 180 min nachfixiert und danach in eine ebenfalls 4 °C kalte 20 % Saccharoselösung überführt. In dieser Lösung verblieb es zur Inkubation über Nacht bei 4 °C, um das Gewebe später vor möglichen Gefrierschäden während des nachfolgend beschriebenen Einfriervorgangs zu schützen. Um das Gewebe einzufrieren, wurde es für 30 sec in mit Trockeneis gekühltes n-Hexan getaucht und dadurch peripher schockgefroren. Anschließend wurde das Gehirn mit der Cortexseite nach unten für 3 min auf ein Stück vorgekühlte Aluminiumfolie gelegt, welches sich auf einem Trockeneisblock in einer geschlossenen Styroporbox befand. Bis zur weiteren Verwendung wurde es danach in das Stück Aluminiumfolie gewickelt und in luftdicht versiegelbaren Plastiktütchen zum Schutz gegen Austrocknung eingepackt. Danach konnte es bis zur weiteren Verwendung bei -60 °C gelagert werden, es konnten nach Positionierung oder direkt im Cryostat Gefriergewebeschnitte angefertigt werden.

4.1.2 Anfertigung coronaler Cryostat-Gewebeschnitte

Zur Anfertigung serieller, coronaler Gefrierschnitte wurde das Gehirn anhand von Einbettmedium (Tissue Tec) mit der caudalen Schnittfläche nach unten auf einen Objekthalter im Cryostaten bei -25 °C Kammertemperatur aufgeblickt. Ein Neigungswinkel von 70° der ventralen Gehirnseite gegenüber der Schnittfläche erleichterte dabei die spätere Ausrichtung im Cryostaten und das Schneiden. Die geregelte Temperatur des Objekthalters betrug

während des Schneidevorgangs -15 °C. Anhand der bilateralen Symmetrie nahezu aller Gehirnstrukturen, besonders jedoch der beidseitig gleichmäßigen Öffnung der Lateralventrikel, des *Chiasma opticum*, der *Commissura anterior* und des *Hippocampus*, sowie durch den Abgleich mit einem Atlas für coronale Gehirnschnitte des Rattengehirns (Paxinos und Watson, 2005) wurde das Gehirn im Cryostaten auf eine exakte coronale Schnittebene ausgerichtet.

Bei rostrocaudaler Schnittrichtung wurde kurz vor Beginn des *Chiasma opticum* mit der Aufnahme von seriellen, 20 µm dicken Schnitten für die immunhistochemischen Markierungen begonnen. Dazu wurden jeweils 4-5 Schnitte auf einen im Cryostaten vorgekühlten und mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgebracht und sofort durch leichtes Erwärmen der Rückseite mit dem Finger aufgezogen. Bis zum Abschluss des Schneidevorgangs wurde jeder so gewonnene Objektträger in eine eisgekühlte Box überführt. Um die Markierung mehrerer Antigenkombinationen oder das Resultat unterschiedlicher immunhistochemischer Protokolle an Gehirnstrukturen und Nuclei eines Tieres unmittelbar miteinander vergleichen zu können, wurden teilweise zwei parallele Schnittserien desselben Gehirns mit einfach alternierender Schnittfolge erstellt.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen zur Verteilung des APJ-Rezeptors und der Apelinpeptide in (extra-) hypothalamischen Strukturen war es zunächst wichtig, mit diesen vertraut zu werden. Hilfreich erwies sich dazu die Erstellung eines permanenten Atlanten mit Gefriergewebeschnitten eines Rattengehirns. Dafür wurde eine adulte männliche Ratte mit 250 g Körpergewicht transkardial mit 4 °C kalter 4 % PFA perfundiert (*siehe Kap.4.1.1.2*). Die nachfolgend im Cryostaten angefertigten, seriellen coronalen Gehirnschnitte (20 µm) wurden - wie für das Gehirn neonataler Ratten in *Kap. 1.1.4* beschrieben - mit Kresylviolett gefärbt.

4.2 Immunhistochemische Markierungen an Gehirngewebeschnitten

4.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- PFA-Lösung (4 %)
- Gelatine-Lösung zur Objektträgerbeschichtung

Enionisiertes Wasser mit
 0,5 % Gelatine
 0,05 % Chromalaun

- Phosphatgepufferte Saline (PBS) pH 7,4

28 mmol/l Na_2HPO_4
 72 mmol/l NaH_2PO_4

- PBS-T-Lösung

PBS mit 0,05 % TritonX-100

- Blocklösung

PBS mit
 10 % Donkeyserum
 0,3 % TritonX-100

- Antikörperlösung

PBS mit
 2 % Donkeyserum
 0,1% TritonX-100

- 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)-Lösung

PBS mit 300 nmol/l DAPI

4.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung auf Inkubationsplatten

Nachdem bei der Anfertigung der coronalen Gefriergewebeschnitte alle für die immunhistochemische Markierung eines Versuches benötigten Schnitte aufgenommen waren, wurden die Objektträger für 3 x 5 min in PBS bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gewaschen, um die Gehirnschnitte zu rehydrieren und mögliche Reste des Einbettmediums zu entfernen. Anschließend wurden die einzelnen Objektträger sequenziell aus den Boxen entnommen und auf spezielle Inkubationsplatten überführt. Dazu dienten Plexiglasschienen (28,5 x 6,3 cm), auf welche jeweils an den Längsseiten ein 8 mm breites Stück Gewebeland mit einer Dicke von 125 µm aufgebracht war. Auf diese Erhöhung wurden die Objektträger mit den Schnitten nach unten aufgelegt, so dass sich alle Schnitte über dem Hohlraum (180-200 µl Volumen) zwischen Schiene und Objektträger befanden. Durch das geringe Volumen ließ sich die Antikörpermenge pro Markierung gegenüber anderen Methoden deutlich reduzieren.

Nach dem Aufbringen von jeweils drei bis vier Objektträgern wurde der Hohlraum zwischen den Objektträgern und der Inkubationsschiene mit einer Pipette luftblasenfrei mit Blocklösung gefüllt. Anschließend wurden mehrere Inkubationsschienen mit ihren Objektträgern in Metallboxen mittels Abstandshaltern übereinandergestapelt. Bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte so für zwei Std. inkubiert. Dieser Präinkubationsschritt diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und somit der Reduktion unspezifischer Markierungen durch die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. Um ein Austrocknen während dieser Zeit zu vermeiden, wurden die Metallboxen mit in entionisiertem Wasser getränkten Zellstoff ausgelegt. Nach Ablauf der Präinkubation wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten vorsichtig wieder von den Inkubationsplatten abgenommen, kurz abtropfen gelassen und erneut auf saubere und trockene Inkubationsschienen aufgelegt. Anschließend wurde, wie zuvor für die Blocklösung beschrieben, Antikörperlösung in den Hohlraum zwischen Inkubationsplatten und Objektträger gefüllt. (Für eine Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper siehe *Tabelle 4*). Darauf folgend wurden diese erneut in die Metallboxen gestapelt und für 36-48 Std. bei 4 °C inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation mit den Primärantikörpern wurden die Objektträger erneut von den Inkubationsschienen abgenommen und auf dem Schüttler 3 x 5 min in PBS gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte, wie oben für die Blocklösung beschrieben, die Inkubation mit den sekundären, fluorophorgekoppelten Antikörpern. Dabei war darauf zu achten, die Inkubationslösung selbst sowie die benetzten Objektträger während des restlichen Protokolls möglichst wenig Licht auszusetzen, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu minimieren. Daher erfolgte die Inkubation lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 2 Std. in den Metallboxen.

Nach diesem Zeitraum wurden die Objektträger, wie oben beschrieben, abermals dreimalig mit PBS gewaschen. Zur Darstellung der Zellkerne der Neurone sowie Gliazellen wurden die Gehirnschnitte anschließend für 10 min bei Raumtemperatur in DAPI-Lösung (300 nmol/l) inkubiert. Dabei bindet DAPI als interkalierendes Agens an AT-reiche Sequenzen im Bereich der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix, bei zusätzlich möglicher Markierung der RNA (Tanius et al., 1992). Die RNA-gebundene Form des Fluorophors emittiert bei maximal Licht einer Wellenlänge von 500 nm, verglichen mit Licht der Wellenlänge von 460 nm bei der Bindung an doppelsträngige DNA (Kapusinski, 1990). Da die RNA-gebundene Form eine

wesentlich geringere Fluoreszenzintensität aufweist, kann bei einer Messung der Emission bei 460 nm somit von einer Spezifität des Farbstoffs für doppelsträngige DNA ausgegangen werden. Nach erneutem 3 x 5 min Waschen in PBS wurden die Objektträger mit speziellen langen Deckgläschen gedeckelt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Einbettmedien verwendet. Das zunächst flüssige Hydromount verfestigte sich nach kurzer Zeit und bedingte somit eine längere Haltbarkeit der Präparate. Das dauerhaft flüssige Citifluor hingegen diente zur unmittelbaren Auswertung der Markierungen. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Objektträger in speziellen Mappen lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper zur immunhistochemischen Markierung in Gefriergewebeschnitten des Rattengehirns mit jeweiligem Verdünnungsfaktor.

Primärantikörper	Host	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Apelin12	rabbit	1:500	Cy3 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	1:1000
Apelin17	rabbit	1:500	Cy3 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	1:1000
APJ-R	rabbit	1:1000	Cy3 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	1:1000
APJ-G	goat	1:500	Alexa 488 donkey anti-goat IgG (H+L)	1:500
FOS	rabbit	1:1000	Cy3 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	1:1000
nNOS	mouse	1:1000	Alexa 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	1:500

4.2.3 Immunfluoreszenzmarkierung „Free floating“ Methode

Für diese Methode wurden coronale Gefrierschnitte des Rattengehirns nicht mit dem Cryostaten, sondern mit einem Cryomikrotom bei einer Schnittdicke von 40 µm angefertigt. Dazu wurde das Gewebe durch CO₂-Kühlung auf den Objekthalter aufgefroren und anschließend für eine optimale Schnittebene, analog wie in Kap. 4.1.2 beschrieben, zum Messer ausgerichtet. Während des Schneidevorgangs wurden die Gefrierschnitte mit einem Marderhaarpinsel direkt vom Cryomikrotom abgenommen und in ein mit PBS gefülltes Rondell aus Plexiglas überführt. Dieses war tortenartig in mehrere Sektoren unterteilt, um die Schnitte später besser bestimmten Gehirnregionen zuordnen zu können.

Waschperioden mit PBS sowie Inkubationszeiten mit den Primär- und Sekundärantikörpern sowie gegebenenfalls Cy3-markiertem Streptavidin waren identisch zu denen bei der unter Kap. 4.2.2 beschriebenen Methode. Während der Inkubationsschritte verblieben die Schnitte dabei „frei“ schwimmend in den Lösungen der Reaktionsgefäße. Mit einem Marderhaarpinsel konnten sie dann jeweils in andere Gefäße und Lösungen transferiert werden. So wurden die

PBS-Waschschritte jeweils in dem zuvor erwähnten Rondell mit Sektoren durchgeführt. Alternativ dazu konnte auch eine 12-Well-Platte mit speziellen Siebeinsätzen zum schnelleren Überführen der Schnitte verwendet werden. Die so prozessierten Gewebsschnitte wurden jedoch erst nach Abschluss des gesamten Protokolls auf gelatinebeschichtete Objektträger (OT) aufgezogen. Zur Beschichtung der OT wurden diese zunächst für zwei Std. in Seifenlauge inkubiert, mit fließendem Leitungswasser abgespült und zur Entfettung mit 70 % Ethanol und entionisiertem Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurden die OT für 10 sec in Gelatinelösung (*siehe 4.2.1*) getaucht und im Trockenschrank (60 °C) getrocknet.

Die Markierungsmethode des „free floating“ lieferte bessere Ergebnisse der Immunfluoreszenzmarkierung als die Standard-Methode, da die Antikörper von allen Seiten in die Schnitte diffundieren konnten. Als nachteilig erwiesen sich jedoch der höhere Antikörperverbrauch und die höhere Schnittdicke bei der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Diese Methode wurde nur für den Kontrollversuch zur Absättigung des APJ-Antikörpers verwendet (*siehe Kap. 4.4.3*).

4.2.4 Biotinverstärkung des Fluoreszenzsignals

Ergaben sich bei der Durchführung der Inkubationsplatten-Methode zu schwache Fluoreszenzsignale, so konnte das emittierte Signal über die Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers verstärkt werden (*Abbildung 19B*). Diese Methode wurde bei den immunhistochemischen Kartierungen und der Co-Expressionsstudie mit nNOS für den immunhistochemischen Nachweis des APJ-Rezeptors angewandt. Dazu wurde bis nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wie im Standard-Protokoll (*siehe oben*) verfahren. Um unspezifische, endogene Bindungsstellen für Streptavidin bzw. Biotin abzusättigen, wurde ein Avidin/Biotin-Blocking-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Alle nachfolgend beschriebenen Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur. Bei der in *Kap. 4.2.2* dargestellten Methode geschah dies auf den Inkubationsplatten, bei der „free floating“-Methode in den entsprechenden Reaktionsgefäßen. Das Gewebe wurde mit den beiden Blocklösungen dabei für jeweils 15 min inkubiert. Dazwischen und danach wurde jeweils 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Dann konnte das Gewebe für zwei Std. bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert werden. Anschließend erfolgten ein weiterer Waschschritt mit PBS und die Inkubation mit Cy3-

gekoppeltem Streptavidin (Verdünnung 1:1000). Nach Abschluss eines letzten Waschschrilles wurden die Objektträger mit den Schnitten wie oben beschrieben gedeckelt.

4.2.5 Semiquantitative Kartierung des APJ-Rezeptors

In diesem Versuch sollten vorrangig hypothalamische sowie vereinzelt extrahypothalamische Kerngebiete entsprechend der Expressionsstärke des APJ-Rezeptors nach indirekter Immunfluoreszenzmarkierung unter Benutzung des gegen rAPJ gerichteten, polyclonalen Kaninchen Antikörpers (1:1000) kartiert werden. Dazu wurden nach dem immunhistochemischen Standard-Protokoll auf Inkubationsschienen (Kap. 4.2.2) für rAPJ fluoreszenzmarkierte, coronale Gefriergewebeschnitte (20 µm) verwendet. Diese stammten aus den Gehirnen von drei zuvor mit 4 % PFA perfundierten, adulten männlichen Wistar Ratten (250-300 g) der Institutszuchtcolonie. Die untersuchten Regionen und Substrukturen wurden durch eingehende mikroskopische Untersuchung nach Intensität (0, X, XX und XXX) und subzelluläre Lokalisation (Perikaryen, dendritische sowie axonale Nervenfasern, Punctata) der rAPJ-spezifischen Immunfluoreszenzmarkierungen beurteilt. Aus den Kartierungsergebnissen aller drei Tiere wurde für jede Region das entsprechende Mittel gebildet.

4.2.6 Co-Expression von APJ und nNOS

Ziel dieses Experimentes war es, auf histologischer Ebene einen möglichen Zusammenhang zwischen dem apelinergen Signaltransduktionsweg und dem Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) zu untersuchen. Dazu sollte die Co-Expression von APJ und neuronaler Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) in den hypothalamischen Strukturen untersucht werden, in welchen APJ-immunpositive Zellkörper anhand der Kartierungsstudie ermittelt werden konnten, namentlich dem *Nucleus arcuatus* (ARC), dem PVN, dem SON und der rostralen Komponente des SON (SOR). Verwendet wurden dazu die Gehirne von vier, zuvor ebenfalls mit 4 % PFA perfundierten, adulten männlichen Wistar Ratten (250-300 g) der Institutszuchtcolonie. Von diesen wurden coronale Gefriergewebeschnitte der entsprechenden Regionen angefertigt und ebenfalls anhand des immunhistochemischen

Standard-Protokolls auf Inkubationsschienen (*siehe Kap. 4.2.2*) entsprechend für rAPJ und nNOS markiert (jeweils 1:1000, *siehe Tabelle 4*).

Für die Auswertung wurden drei bis fünf serielle Schnitte pro hypothalamischen Kerngebiet und Tier ausgewertet. Dazu wurden mittels der an das Mikroskop angeschlossenen Kamera bei 200-facher Vergrößerung digitalisierte Aufnahmen der entsprechenden Regionen gespeichert. Anhand des Programms Metamorph wurden auf diesen die für APJ, nNOS und die Co-Lokalisierung der beiden immunpositiven Zellen manuell markiert und gezählt. Für jedes Kerngebiet wurde pro Tier aus den ermittelten Zellzahlen der jeweils ausgewerteten Aufnahmen der Mittelwert gebildet. Anschließend wurden aus dem so errechneten Ergebnis Mittelwerte und Standardfehler (S.E.M.) aus allen vier Tieren für jedes Kerngebiet errechnet.

4.3 Cytoimmunfluoreszenzmarkierung in den Primärkulturen

4.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Für Details siehe auch (*Kap. 4.2.1*)

- PFA-Lösung (4 %)
- Phosphatgepufferte Saline (PBS) pH 7,4
- PBS-T-Lösung
PBS mit 0,05 % TritonX-100
- Block-/Antikörperlösung
PBS-T mit
10 % Fetalem Kälberserum
- DAPI-Lösung

4.3.2 Durchführung

Dieses Protokoll wurde zur Immunfluoreszenzmarkierung spezifischer Antigene in den neuroglialen Primärkulturen (PVN, MnPO, ARC) und der primären Zellkultur des Hypophysenzwischenlappens (HZL) angewandt. Die Zellen der neuroglialen Kulturen waren nach einer Kultivierungszeit von 4-5 Tagen, diejenigen der HZL-Kulturen nach 7-9 Tagen ausdifferenziert und zeigten im Falle der HZL-Kulturen semikonfluentes Wachstum. In

diesem Zustand wurden sie für die Markierungen verwendet. Dazu wurden die Deckgläschen, auf denen die Zellen kultiviert wurden, vorsichtig von den Flexipermwänden der Mikrokammern (*siehe Kap. 1.1 und 1.2*) abgelöst, in eine 12-Well-Platte überführt und zur Fixierung der Zellen sofort für 15 min mit eiskaltem 4 % PFA überschichtet. Nach Ablauf der Fixierungszeit wurde das PFA wieder entfernt und die Gläschen für 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in Blocklösung für 1 Std. bei Raumtemperatur einer feuchten Kammer, wie für die Gewebeschnitte beschrieben.

Nach diesem Präinkubationsschritt wurde die Blocklösung entfernt und die Zellkulturgläschen mit jeweils 500 µl der Antikörperlösung bedeckt, welche die entsprechenden Primärantikörper in den angegebenen Verdünnungen (*Tabelle 5 und 6*) enthielt. Ebenfalls analog zu den Gewebeschnitten erfolgte die Inkubation in der Metallbox für 36-48 Std. bei 4 °C. Nach Ablauf dieses Zeitraums wurden die Zellkulturgläschen, nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T, mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (*Tabelle 5 und 6*) für 2 Std. bei Raumtemperatur lichtgeschützt in der gleichen Box inkubiert. Nach der Entfernung dieser Antikörperlösung erfolgten ein erneuter Waschschrift sowie eine 10-minütige Inkubation in DAPI-Lösung für die Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne. Durch diese Markierung der Zellkerne konnten später die Gesamtzellzahl eines Deckgläschens und daraus das jeweilige Verhältnis der Anzahl für ein bestimmtes Antigen immunreaktiver Zellen zur Gesamtzellzahl bestimmt werden. Nach Abschluss der Inkubationszeit in der DAPI-Lösung wurde diese entfernt, die Gläschen erneut dreimalig mit PBS gewaschen und schließlich mit einem Tropfen Citifluor auf einen vorbereiteten Objektträger aufgebracht. Um ein späteres Austrocknen des Präparates zu vermeiden, wurden die Kanten des Gläschens mit Nagellack versiegelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die so präparierten Zellkulturzellen gekühlt und lichtgeschützt in speziellen Mappen bei 4 °C gelagert.

4.3.3 Zelltypbestimmung nach Ca^{2+} -Imaging Analyse

Nach jedem Versuch zur Analyse der apelinergen Modulation der intrazellulären Calcium-Konzentration in den neuroglialen Primärkulturen des PVN und MnPO (*siehe Kap. 2.2*) wurde der Typus der charakterisierten Zellen anhand von antigen- und damit zelltypspezifischer Cytoimmunfluoreszenz ermittelt. Dazu wurde zunächst mit der Kamera des Imaging-Systems ein Durchlichtbild der analysierten Zellpopulation aufgenommen und

deren Position und Lage auf dem eingezätzten Koordinatensystem des Deckgläschens notiert. Nach Fixation der primären Zellkulturen mit PFA (siehe Kap. 4.3.2) wurden Immuncytofluoreszenz-Markierungen für das *microtubule-associated protein* (MAP) 2a+b und das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) nach dem in Kap. 4.3.2 dargestellten Protokoll vorgenommen. MAP2a+b repräsentiert ein Protein der MAP2/Tau Familie, welche die Fähigkeit haben, Mikrotubuli und F-Actin zu binden und zu stabilisieren. Bei Säugetieren wird es hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimiert und konnte deshalb als Markerprotein für diese verwendet werden. GFAP hingegen gilt als ein für Astrozyten spezifischer Marker des Cytoskeletts dieser Zellen und stellt darüber hinaus einen wichtigen Faktor im Entwicklungsprozess dieser Zellen dar. Zusätzlich wurde in einigen Fällen Oligodendrozyten anhand einer positiven Immunreaktion für CNPase (Braun et al., 1988) sowie Mikrogliazellen aufgrund des Nachweises von ED1 (Graeber et al., 1989) charakterisiert (Tabelle 5). Nach Abschluss der Markierung konnten die somit zellphysiologisch und immuncytochemisch charakterisierten Zellen anhand der zuvor notierten Position und Lage auf dem Koordinatensystem des Deckgläschens wiedergefunden und eindeutig bestimmten Zelltypen zugeordnet werden.

Tabelle 5: Antikörper zur Identifikation des Zelltyps nach Ca^{2+} -Messung in den neuroglialen Kulturen von PVN und MnPO. Die entsprechenden Sekundärantikörper wurden abhängig von der jeweiligen Kombination der Primärantikörper gewählt. CNPase: 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; GFAP: glial fibrillary acidic protein; MAP: microtubule-associated protein; nNOS: nitric oxide synthase

Primärantikörper	Host	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
CNPase	mouse	1:600	Alexa 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	1:500
ED1 (CD68)	mouse	1:1000	Cy3 goat anti-mouse IgG (H+L)	1:1000
GFAP	rabbit	1:800	Alexa 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	1:500
MAP (2a+2b)	mouse	1:600	Cy3 donkey anti-mouse IgG (H+L)	1:1000
nNOS	rabbit	1:1000	Alexa 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	1:1000

Um eine mögliche Beteiligung von NO als nachgeschaltetem, gasförmigen Botenstoff im apelinergen Signalweg zu untersuchen (siehe Kap. 2.2.3), erfolgte zusätzlich eine immuncytochemische Markierung der zellphysiologisch charakterisierten Primärkulturen für die Expression der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS). Folglich wurden Dreifachmarkierungen mit Antikörpern gegen MAP2a+b, GFAP und zusätzlich nNOS durchgeführt. Die Antikörper für nNOS und GFAP entstammten der gleichen Spezies (Kaninchen) und wurden deshalb mit dem gleichen Sekundärantikörper markiert (Tabelle 5).

Für MAP2a+b wurde hingegen der Sekundärantikörper Cy3-donkey anti-mouse IgG verwendet. Eine Co-Lokalisation der Immunfluoreszenzsignale für MAP2a+b und nNOS in Zellen ließ bei der Auswertung auf nNOS positive Neurone schließen.

4.3.4 Charakterisierung der primären Hypophysenzwischenlappen (HZL) kultur

Der Zwischenlappen der Hypophyse (HZL) produziert bei der Ratte Produkte des Proopiomelanocortin (POMC)-Gens wie α -MSH, ACTH, CLIP oder β -Endorphin. Zusätzlich wurden im HZL bereits *pituitary adenylate cyclase-activating peptide* (PACAP) (Kimura et al., 1994), Apelin (Reaux-Le Goazigo et al., 2007) und in der Grenzschrift zum Hinterlappen auch nNOS (Crack et al., 1997) nachgewiesen. Die ausgeprägte zelluläre Expression von APJ im Bereich des gesamten Zwischenlappens (*siehe Erg. Kap. II.1.2 und II.4.2*) legen eine detaillierte Studie zur quantitativen Erfassung möglicher Co-Expressionsmuster für APJ und einiger der genannten peptidergen Faktoren in der HZL-spezifischen Primärkultur nahe. Für diese immuncytochemische Charakterisierung wurden verschiedene Antikörper-Seren im Rahmen von Doppelmarkierungsstudien verwendet (*Tabelle 6*).

Tabelle 6: Antikörperf kombinationen mit der in den Immuncytofluoreszenzmarkierungen verwendeten Verdünnungen zur Charakterisierung der primären Zellkultur des Hypophysenzwischenlappens (HZL)- der Ratte; (G)=goat, (R)=rabbit, (M)=mouse, (D)=donkey

	1.Primär-antikörper		2.Primär-antikörper		1.Sekundär-antikörper		2.Sekundär-antikörper	
1	APJ (G)	1:500	APJ (R)	1:1000	488-D anti-R	1:500	Cy3-D anti-G	1:1000
2	nNOS (R)	1:1000	nNOS(M)	1:1000	Cy3-D anti-R	1:1000	488-D anti-M	1:500
3	APJ (G)	1:500	nNOS (R)	1:1000	Cy3-D anti-G	1:1000	488-D anti-R	1:500
4	APJ (R)	1:1000	nNOS(M)	1:1000	Cy3-D anti-R	1:1000	488-D anti-M	1:500
5	APJ (G)	1:500	PACAP38 (R)	1:1000	488-D anti-G	1:500	Cy3-D anti-R	1:1000
6	APJ (G)	1:500	Apelin12 (R)	1:1000	488-D anti-G	1:500	Cy3-D anti-R	1:1000
7	APJ (G)	1:500	ACTH (R)	1:5000	Cy3-D anti-G	1:1000	488-D anti-R	1:500

Zur Auswertung der immuncytochemischen Charakterisierung der HZL-Primärkultur wurden HZL-Zellen aus 3-4 Präparationen verwendet. Nach der Durchführung der Doppelmarkierungen (*Kap. 4.3.2*) wurden mittels der an das Mikroskop angeschlossenen

Kamera bei 200-facher Vergrößerung digitalisierte Aufnahmen erstellt. Dies geschah pro Präparation und für jede in *Tabelle 6* aufgeführte Doppelmarkierungskombination an 4-6 randomisierten und mit Zellen bewachsenen Stellen eines Deckgläschens. Die Auswertung und manuelle Zählung erfolgte an diesen Aufnahmen ebenfalls anhand von Metamorph. Anhand einer ebenfalls durchgeführten DAPI-Färbung wurde zunächst die Gesamtzellzahl in dem auszuwertenden Bildausschnitt bestimmt.

Daraufhin wurde in diesem Bereich die Anzahl der für jeweils eine der Markierungen immunpositiven Zellen und danach die Anzahl der entsprechend für beide Antigene immunpositiven, doppelt markierten Zellen bestimmt. Anschließend wurde von diesen Zahlen jeweils die Relation zur Gesamtzellzahl einer ausgewerteten Aufnahme errechnet und daraus der jeweilige Mittelwert aller 4-6 Aufnahmen ermittelt. Aus den so erhaltenen Mittelwerten jeder Präparation wurde schließlich der finale Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler (S.E.M.) errechnet. Für eine weitere Darstellung der Ergebnisse wurde ebenso für alle Präparationen das Verhältnis der Anzahl der jeweils für eine der Markierungen positiven zu den entsprechend doppelt markierten Zellen bestimmt und der jeweilige Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler (S.E.M.) aus den Mittelwerten der Einzelpräparationen ermittelt.

4.4 Kontrollen

4.4.1 Kontrollen ohne Erstantikörper

Um eine unspezifische Bindungsaktivität der für die immunhistochemischen Markierungen sowohl im Gefriergewebeschnitt als auch an den primär kultivierten Zellen verwendeten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper auszuschließen, wurden diese in Abwesenheit des/der jeweiligen Primärantikörper(s) getestet. Dazu wurde das entsprechende Protokoll (*siehe Kap. 4.2.2 und 4.3.2*) an einigen Objektträgern bzw. Zellkulturgläsern ohne vorherige Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper(n) durchgeführt.

4.4.2 Doppelmarkierung mit zweitem Primärantikörper

Zur indirekten Überprüfung der Antigen-Spezifität der Primärantikörper gegen APJ sowie nNOS wurden immunhisto- sowie -cytochemische Doppelmarkierungen an den Gefrier-

schnitten des Rattenhypothalamus bzw. an Zellen der HZL-Primärkultur durchgeführt. Dafür wurde vergleichend am selben Gehirnschnitt bzw. an derselben Primärkultur zusätzlich ein zweiter, gegen ein unterschiedliches Epitop des gleichen Proteins, gerichteter Antikörper verwendet, der zudem aus einer anderen Hostspezies stammte (*siehe Tabelle 7*). Im Falle des Nachweises der APJ-Rezeptor Expression sowohl in der Zellkultur als auch im Gehirnschnitt wurde der parallele Einsatz eines *rabbit anti-rat* APJ und eines *goat anti-human* APJ Antiserums/-körpers ausgeführt. Für den immunocytochemischen Nachweis der nNOS wurden lediglich in den primär kultivierten HZL-Zellen Doppelmarkierungen mit einem *mouse anti-human* nNOS und *rabbit anti-rat* nNOS durchgeführt.

Tabelle 7: Antikörper zur immunhisto- und cytochemischen Doppelmarkierung von APJ und neuronaler NO-Synthase (nNOS) mit Antigenbezeichnung, „Host“-Spezies, Reaktivität sowie Aminosäuresequenz des Epitops und Spezifität des Antigens (=Reaktivität).

Antigen	Host	Reaktivität	Immunisierungssequenz
APJ-R	rabbit	rat	Aminosäuren 225-240 Sequenz: CTIAGHFRKERIEGLRK
APJ-G	goat	human	Aminosäuresequenz in cytoplasmatischer Domäne
NOS1	rabbit	rat	C-terminal nahe Aminosäuresequenz
NOS1	mouse	human	Aminosäuren 2-300

4.4.3 Antigen-Absättigung des APJ-Antikörpers

Um die spezifische Bindungskapazität des rAPJ-spezifischen Antikörpers APJ-R speziell für die angegebene Immunisierungssequenz zu überprüfen, wurden immunhistochemische Markierungen in Gegenwart eines „*binding*“ Peptids (CTIAGHFRKERIEGLRK) mit der antigenen Aminosäuresequenz für diesen Antikörper durchgeführt. Zur Bestimmung der einzusetzenden Dosis des Blockingpeptids wurde zunächst die molare Konzentration des für die Markierungen verwendeten Antikörpers ($6,66 \times 10^{-9}$ mol/l) berechnet, basierend auf der Molekularmasse eines IgG-Molekül (150-kDa) (Roberts-Thomson und Shepherd, 1990) und der normalerweise eingesetzten Antikörperkonzentration (1 µg/ml). Die immunhistochemischen Markierungen wurden an hypothalamischen Gewebeschnittserien (40 µm) einer adulten Ratte (*Kap. 4.1*) durchgeführt. Für eine Schnittserie wurde dabei die zur Markierung verwendete Primärantikörperlösung mit einer Konzentration von $5,55 \times 10^{-7}$ mol/l des Blockingpeptids abgesättigt somit betrug das molare Verhältnis Antikörper zu Blockingpeptid

in dieser Lösung 1:83. Der andere Teil der Schnitte wurde mit normaler, nicht abgesättigter Antikörperlösung, inkubiert. Vor Einsatz der beiden Antikörperlösungen wurden diese für 24 Std. im Kühlschrank vorinkubiert. Zur Durchführung der Markierungen wurde schließlich das „free-floating“-Protokoll (Kap. 4.2.3) mit einer zusätzlichen Biotin-Avidin-Verstärkung (Kap. 4.2.4) angewendet.

5. Fluoreszenzmikroskopie

Für alle Aspekte der Bildanalyse und Auswertung der histo- und cytologischen Immunfluoreszenzmarkierungen in den unterschiedlichen primären Zellkulturen sowie den Gefriergehirnschnitten wurde ein Fluoreszenzmikroskop (BX50) mit Objektiven 10-, 20-, 40-, und 100-facher Vergrößerung verwendet. Zur Erzeugung der Anregungswellenlängen der Fluorophore in den Präparaten diente eine Quecksilberdampflampe (BH2-RFL-T3), dessen Licht über entsprechende Filter auf das Präparat geleitet wurde. Alexa488-gekoppelte Immunglobuline wurden mittels eines Fluoreszenzfiltermoduls für Breitband-FITC (U-MWIBA) bei einer Wellenlänge von 460-490 nm angeregt. Für Markierungen mit Cy3-konjugierten Antikörpern wurde das entsprechende Filtermodul (U-MNIG) bei einer Anregungswellenlänge von 520-550 nm verwendet. Zur Exzitation DAPI-gefärbter Zellkerne schließlich wurde ein Filtermodul zur Breitband-UV-Anregung (U-MWU) mit einer Wellenlänge von 330-385 nm benutzt. Anhand einer an das Mikroskop angeschlossenen Schwarzweißkamera (Visicam 12 Bit) konnten Bilder der Präparate angefertigt werden. Anhand eines mit der Kamera verbundenen Computers und der Software Metamorph (Version 5.05) konnten die unterschiedlichen Aufnahmeparameter gesteuert werden. Weiterhin erfolgte mit diesem Programm die Erstellung von farbigen Mehrkanal-RGB-Bildern aus den schwarz-weißen Einzelkanalaufnahmen. Die Nachbearbeitung der Bilder im Hinblick auf Helligkeit und Kontrast und die Zusammenstellung zu Bildtafeln erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop (Version 5.5).

6. SDS-PAGE und Western Blot Analyse für APJ im Hypophysen-zwischenlappen (HZL) der Ratte

Western Blots werden dazu verwendet, mithilfe antigen-spezifischer Antiseren ein bestimmtes Protein bzw. entsprechende Modifikationen dieses Proteins, zum Beispiel aufgrund einer Phosphorylierung in Proteinextrakten von Organen, Gewebe oder kultivierten Zellen, nachzuweisen. Dabei erlaubt diese Methode anhand der elektrophoretischen Auftrennung des eingesetzten Proteingemischs einer Probe die exakte Bestimmung der Molekülmasse des detektierten Antigens. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen sollte zum einen die in der Hypophyse durch Verwendung des APJ-R Antikörpers beobachtete APJ-Immunreaktivität (*Erg. Kap. II. 4.2*) und somit die Spezifität der weiteren immunhistochemischen Markierungen (*Kap. 4.2.5*) bestätigt werden. Zum anderen sollte die in der Literatur durch Stimulation mit Apelin beschriebene Aktivierung von „downstream“ Signalwegsmolekülen - in diesem Fall die Phosphorylierung der *extracellular regulated kinase 1/2* (ERK1/2) - an Zellen der primären Hypophysenzwischenlappen- (HZL) und vergleichend -vorderlappenkultur (HVL) untersucht werden. Die Präparation des HZL erfolgte dabei wie in *Kap. 1.2.2* beschrieben. Zu Beginn wurden die verwendeten Gewebeproben zunächst mechanisch lysiert und die Proteine aus dem Lysat extrahiert. Anschließend erfolgten eine Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode, eine Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und schließlich der Western Blot.

6.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- Lysis-Puffer Proteinextraktion

50 mmol/l	Tris-HCl (pH 8,0)
2 mmol/l	EDTA
1 %	Nonidet (NP40)
10 %	Proteaseinhibitor Cocktail
1 %	Phosphataseinhibitor Cocktail

- Bradford Protein Assay (Sigma Aldrich)

- Laemmli-Puffer (Bio-Rad-161-0737)

62,5 mmol/l	Tris-HCl (pH 6,8)
25 %	Glycerin
2 %	SDS = Sodium dodecyl sulfate

0,01 % Bromphenolblau
5 % β -Mercaptoethanol

- Trenngelpuffer

1,5 mol/l Tris-HCl, (pH = 8,8)
0,4 % SDS

- Sammelgelpuffer

0,5 mol/l Tris-HCl, (pH = 6,8)
0,4 % SDS

- Laufpuffer

25 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3)
192 mmol/l Glycin
0,1 % SDS

oder
Laufpuffer (x10) (Bio-Rad-161-0732)

- Blotting Puffer

25 mmol/l Tris-HCl, (pH 8,3)
192 mmol/l Glycin
20 % Methanol

- Coomassieblaufärbelösung

0,1 % Coomassie Brilliant Blau R-250
50 % Ethanol
10 % Eisessig

- Entfärbelösung

50 % Methanol
10 % Eisessig

- Trockenlösung

4 % Glycerin
20 % Ethanol

- TBS

20 mmol/l Tris-HCl, (pH 7,4)
500 mmol/l NaCl

- TBS-T

0,1 % Tween in TBS
oder
TBS-T (10x; Bio-Rad 170-6404)

- Blocklösung

10 % Magermilchpulver in TBS-T

- Antikörperlösung

5 % Magermilchpulver in TBS-T

- „enhanced chemiluminescence“ (ECL)- Detektionslösung (selbstgemacht)

Lösung A: 0,1 mol/l Tris-HCL (pH 8,6) - 200 ml
50 mg Luminol

Lösung B: Parahydroxycumarinsäure 11 mg
10 ml DMSO

Lösung C: 30 % H₂O₂

Ansatz: 5 ml A + 500 µl B + 1,5 µl C

6.2 Lyse des Gewebes und Proteinbestimmung durch Bradford Assay

Um die zu analysierenden Gewebeproben in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in Gegenwart von SDS sowie im anschließenden Western Blot einsetzen zu können, mussten diese zunächst lysiert und alle Proteine/Peptide aus dem Lysat extrahiert werden. Dazu wurden die zu homogenisierenden frischen bzw. zuvor tiefgefrorenen Gewebeproben jeweils in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 3 µl Lysispuffer pro mg Gewebe unter Zusatz von 10 % Protease- und 1 % Phosphataseinhibitor-Cocktail versetzt. Durch diese Behandlung sollte eine vorzeitige Proteindegradation durch endogene Proteasen verhindert werden. Anschließend wurde das Gewebe mittels eines Ultraschallhomogenisators für nur 10 sec bei gleichzeitiger Kühlung auf Eis zerkleinert. War nach dieser Zeit das Gewebe noch nicht vollständig homogenisiert, wurde vor einer erneuten Ultraschallbehandlung das Gefäß zur Abkühlung für 2-5 min auf Eis gekühlt. Nach vollständiger Homogenisierung die Proben bei 14,000 Umdrehungen pro min (RPM) in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der die Proteine enthaltende Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Mit einem Aliquot jeder Probe wurde darauffolgend eine Bestimmung der Proteinkonzentration anhand des Bradford Assays in 96-Well-Platten vorgenommen. Die zugrunde liegende Methode beruhte auf der Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit den Proteinen in saurer Lösung, wodurch der Farbstoff in seiner blauen, nicht protonierten Sulfonatform stabilisiert wird. Diese Reaktion führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm

(Bradford, 1976). Der Absorptionszuwachs bei 595 nm wurde dabei mittels eines Photometers oder eines ELISA-Readers aufgezeichnet und erwies sich im linearen Messbereich als proportional zur Proteinkonzentration.

Zur Erstellung einer Standard-Kurve wurden für jeden Versuchsansatz eine Verdünnungsreihe (0,1-1,2 mg/ml), ausgehend von einer Rinderserumalbumin-(BSA) Stocklösung (4 mg/ml), angefertigt und die zu messenden Proteinproben 1:80 mit entionisiertem Wasser verdünnt. Als Nullprobe diente 1:80 mit entionisiertem Wasser verdünnter Lysepuffer. Zur Durchführung des Assays wurden jeweils 5 µl der BSA-Standards und der vorverdünnten Blanko- und Proteinproben in einer 96-Well-Platte auspipettiert, wobei immer Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Nach Zugabe von jeweils 250 µl Bradfordreagenz hinzugefügt wurde dann der Inhalt der Wells für 30 sec auf einem speziellen Schüttler vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte die Absorptionsmessung der einzelnen Wells bei 595 nm anhand eines an einen Computer angeschlossenen ELISA-Readers und Auswertung mit dem Programm DigiRead. Über die Geradengleichung der Standardkurve ließen sich in einem Excel-Arbeitsblatt aus den für die Proben gemessenen optischen Dichten, nach Abzug der Werte für Verdünnung und Blankoprobe, die jeweilige Proteinkonzentration bestimmen. Alle Konzentrationen des Assays wurden doppelt bestimmt und aus diesen der Mittelwert errechnet. Um die für den Westernblot nötige Endkonzentration von 5 µg/µl zu erreichen, wurden der verbleibende Rest der unverdünnten Proben entsprechend mit entionisiertem Wasser verdünnt, ausaliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -55 °C gelagert.

6.3 Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot

Um die Proteine des HZL-Gewebes entsprechend ihrer Molekularmasse mittels horizontaler SDS-PAGE aufzutrennen, wurde ein Polyacrylamidgel bestehend aus 10 % Trenngel (unten) und 5 % Sammelgel (oben) angefertigt (*siehe Tabelle 8*). Von der Mischung der Substanzen des Trenngels wurden je 3,6 ml pro Gelkammer mit einer 1000 µl Eppendorfpipette zwischen die Glasscheiben des Gelsystems gefüllt, sofort mit Isopropanol überschichtet und für 1,5 Std. auspolymerisiert. Nach dieser Zeit wurde das Isopropanol wieder abgenommen, die Bestandteile des Sammelgels gemischt und auf das nun auspolymerisierte Trenngel pipettiert. Je nach Probenanzahl wurden für die zum Einfüllen der Proben benötigten Taschen die

entsprechenden Gelkämme gerade eingesetzt. Nach weiteren 30 min war dieser Teil des SDS-Gels ebenfalls auspolymerisiert.

Tabelle 8: Bestandteile und Mengenangaben für ein 10 % Trenn- und 5 % Sammelgel der SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). AMPS = Ammoniumperoxidsulfat, TEMED= N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Bestandteile	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
Bidest	4 ml	0,5 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5: 1	2 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer	2 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1 ml
AMPS 10 %	25 µl	2 ml
AMPS 0,21 %	-	2 ml
TEMED	5 µl	5 µl

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die Gelkammern in die dafür vorgesehene Halterung eingebaut, die Kammer mit Laufpuffer gefüllt, die Gelkämme entfernt und die entstandenen Taschen im Gel mittels einer 100 µl Pipette mit Laufpuffer ausgespült. Anschließend wurden je 10 µl einer Proteinprobe mit jeweils 10 µl des Laemmli-Puffers vermischt und für 20 min auf 70 °C (anstatt 90 °C) erhitzt, um die Struktur von G-Proteingekoppelten Rezeptor-Proteinen besser zu erhalten. Anhand einer 20 µl Hamiltonspritze oder einer 10 µl Eppendorfpipette wurden die so aufbereiteten Proben danach in die Taschen des Sammelgels eingefüllt. Ebenso wurde mit der zur späteren Transfer- und Laufkontrolle eingesetzten β -Actin Probe verfahren. Als Marker zur späteren Größenbestimmung einzelner Proteinbanden wurde 4 µl Precision Plus Protein Western C-Standard Sample in eine der mittleren Taschen eingefüllt. Unmittelbar nach Beladen des Gels wurden die Kammern an ein Netzgerät angeschlossen und eine konstante Spannung von 120 V für 120 min angelegt. Dadurch erfolgte die Separation der Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse. Nach Beendigung des SDS-PAGE wurden die Gele vorsichtig aus den Gelkammern entfernt und auf die zuvor in Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembranen (5,5 x 8,3 cm) gelegt. Gemäß der Sandwich-Technik wurden jeweils in der gleichen Größe zugeschnittene und mit Transferpuffer getränkte Blottingpapiere von beiden Seiten platziert. Anschließend wurde ein Glasstab mit sanftem Druck über den Stapel gerollt um eventuell vorhandene, den Transfer störende, Luftblasen zwischen Membran und Gel zu entfernen.

Durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 3 mA pro cm² Gel (für ein Gel: 135 mA, für zwei Gele: 270 mA) für 45 min angelegt konnten die auf dem Gel separierten Proteine auf die Nitrocellulosemembran übertragen werden (= blotten). Nach dem Blotten vom Gel auf die Nitrocellulose wurde der erfolgreiche Transfer anhand einer Coomassie-Färbung des Gels überprüft und die Gele zur Aufbewahrung getrocknet. Wie schon für den Bradford-Assay beschrieben, handelt es sich bei Coomassie Brilliant Blau um einen Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die NH₃⁺-Gruppen von Aminosäuren anlagert und somit Proteine unspezifisch anfärbt (Fazekas de St.Groth et al., 1963). Für die Färbung wurden die Gele in einem Glasgefäß für 3 Std. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in der Färbelösung angefärbt. Anschließend wurden sie in Entfärbelösung transferiert und unter wiederholtem Austausch der Lösung auf dem Schüttler inkubiert bis der Gelhintergrund transparent wurde. Damit die Gele bei der Trocknung nicht zerbrachen, wurden sie zunächst 2 Std. in Trocknungslösung inkubiert und dann in einem Geltrocknungsrahmen mit jeweils 1 ml Trocknerlösung transferiert. Beim Schließen der Rahmen war darauf zu achten, dass das Gel auf dem eingespannten Cellophan blasenfrei auflag und mit dem dazwischen enthaltenen Gel im Rahmen gut gespannt war. Bei Zimmertemperatur wurden die Gele für zwei Tage getrocknet und konnten dann beliebig lange aufbewahrt werden.

Um nun die auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine von wissenschaftlichem Interesse „sichtbar“ zu machen, werden entsprechende immunologische Markierungsmethoden angewendet. So wurde die jeweilige Nitrocellulosemembran zunächst dreimal für 5 min in PBS-T gewaschen und danach zum Abblocken unspezifischer Bindungsaktivitäten für 2 Std. bei Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert. Darauffolgend wurde die Membran exakt in der Mitte der Markerbande in zwei Teile zerschnitten. Derjenige Teil der Membran, der die transferierten HZL-Proteine enthielt, wurde anschließend mit dem APJ-R (1:200) Primärantikörper, der andere Teil der Membran mit β -Actin mit einem Antikörper rabbit anti- β -Actin (1:5000) inkubiert. Dies geschah jeweils durch Inkubation in Antikörperlösung bei 4 °C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen erneut jeweils dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion des Signals bei gleichzeitiger Signalverstärkung wurde ein Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppelter (donkey anti-rabbit) Sekundärantikörper (1:2000) verwendet.

Die Inkubation mit dem HRP-Sekundärantikörper sowie dem Antikörper für den Marker StrepTactin-HRP (1:5000) erfolgte in Antikörperlösung für 90 min bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf der Inkubation wurden überschüssige Sekundärantikörper durch einen erneuten dreimaligen Waschschrift mit TBS-T entfernt. Zur anschließenden Detektion des Signals wurde der ImmunStar Western C Substrat Kit mit einer Substratlösung bestehend aus einer 1:1 Mischung von Luminol/Verstärkerlösung und Peroxid-Pufferlösung (0,125 ml pro cm² Nitrocellulosemembran) verwendet. Gleichwertig wurde in den Experimenten auch eine selbst angesetzte ECL Lösung benutzt. Die Membranen wurden jeweils auf einem Schüttler im Dunkeln bei Raumtemperatur für 2 min in den Detektionslösungen inkubiert und anschließend mit einem Gel-Dokumentationssystem fotografiert. Zur Bestimmung der Molekularmasse (MM) einzelner Banden wurde die RF-Methode angewandt. Hierfür wurde zunächst für jede Markerbande der Quotient aus der Entfernung zum oberen auf der Nitrocellulosemembran sichtbaren Rand des SDS-Gels zur Gesamtlänge des Gels gebildet (*retention factor* = RF-Wert), dieser gegen den Logarithmus der MM der jeweiligen Bande graphisch aufgetragen und daraus eine Ausgleichsgerade berechnet. Anhand der Geradengleichung konnten anschließend die Werte für die MMs der unbekannten Banden der aufgetragenen Proteinproben bestimmt werden.

6.4 Der apelinerge Signaltransduktionsweg in Hypophysenzellen: ERK1/2-Phosphorylierung

Eine quantitative Western Blot Analyse wurde darüber hinaus auch durchgeführt, um die etwaige Phosphorylierung der *extracellular regulated kinase 1/2* (ERK1/2) und somit deren Aktivität in Primärkulturzellen des HZLs (*siehe Kap. 1.2*) sowie des HVLs (präpariert durch Fr. F. Fuchs) nach Stimulation mit PyrAp13 zu untersuchen. Durch eine Stimulation mit Apelin13 konnte dies bereits unter anderem an APJ-überexprimierenden HEK293-Zellen gezeigt werden (Bai et al., 2008). Aufgrund der hohen nativ vorkommenden APJ-Rezeptordichte eigneten sich die HZL- und HVL-Zellen zur Untersuchung einzelner Komponenten der apelinergen intrazellulären Signalkaskade. Wie in *Kap. 1.2.2* beschrieben, wurden sowohl die HZL- als auch die HVL-Zellen in Poly-L-Lysin-beschichteten 12-Well-Platten in einer Zelldichte $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml für 6-8 Tage kultiviert.

6.4.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- Serumfreies Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Zellkulturmedium

DMEM mit	
4 mmol/l	L-Glutamin
100 µg/ml	Penicillin/Streptomycin

- Steriles PBS

- Lysispuffer

50 mmol/l	Tris/HCl (pH 6,7)
2 % SDS	
100 mmol/l	DL-Dithiothreitol
40 mmol/l	Glycerolphosphat
10 mmol/l	Natriumorthovanadat

oder

50 mmol/l	Tris/HCl (pH 6,7)
2 % SDS	
100 mmol/l	DL-Dithiothreitol
10 µl	Proteaseinhibitor (Sigma-P8340)
5 µl	Phosphataseinhibitor (Sigma-P2850)

- Benzonaselösung

3 µl Benzonasestocklösung (384 U/µl)+ 12 µl entionisiertes Wasser

6.4.2 Stimulationsprotokoll und Lysis der Zellen

Um eine eventuelle Beeinflussung der proteinanalytischen Messungen durch Serumkomponenten der Primärkulturen (HZL u. HVL) zu vermeiden, wurde 24 Std. vor Beginn der Stimulation das serumhaltige DMEM-Medium entfernt, die Zellen einmalig mit serumfreiem Medium gewaschen und dieses dann durch serumfreies DMEM ersetzt. Alle für die Stimulation benötigten Substanzen wurden ebenfalls in serumfreien DMEM angesetzt. PyrAp13 wurde zur Stimulation in den Konzentrationen von 10^{-6} mol/l und 10^{-8} mol/l in vorgewärmtem, serumfreien DMEM angesetzt. Von dieser Lösung wurden je 500 µl auf die zu stimulierenden HZL- bzw. HVL-Wells gegeben. Die für die Behandlung verwendeten PyrAp13 Aliquots (10^{-4} mol/l) waren in Ca^{2+} -Messpuffer angesetzt. Deshalb wurde als Kontrollgruppe Ca^{2+} -Meßpuffer, 1:100 in DMEM verdünnt verwendet. Während der Stimulation von 15 min wurde die 12-Well-Platte im Inkubator bei 37 °C mit einer CO_2 Konzentration von 5 % und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit

wurde das Medium mit einem Pumpensystem entfernt und die Zellen mit 1 ml eiskaltem PBS je Well zur Vermeidung von Medium-Rückständen inklusive des Indikators Phenolrot gewaschen. Nach dem Entfernen des PBS musste das Zellkulturmaterial für SDS-PAGE und Western Blot Analyse aufbereitet werden. Dazu wurden die Zellen mit 125 µl Lysispuffers je Well für 10 min auf einem Schüttler lysiert und, um anschließend im Lysat vorhandene DNA zu verdauen, unter Zugabe von 1 µl Benzonaselösung (77 U/µl je Well) weitere 10 min inkubiert. Anschließend konnte das Zell-Lysat abgenommen, in Reaktionsgefäße überführt und sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren werden. Bis zur Verwendung in der SDS-PAGE wurden die Proben bei -55 °C gelagert.

Die so gewonnenen Proben wurden an Sibylle Wenzel vom Humanphysiologischen Institut der Justus-Liebig Universität übergeben, welche in Kooperation die Western Blots für ERK2 (p42) und phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2 = p44p/p42p) durchführen ließ. In ihrer Gruppe wurden diese routinemäßig an Kardiomyozyten durchgeführt (Schreckenberget al., 2004). Die als Positivkontrolle verwendeten, primär kultivierten Kardiomyozyten wurden ebenfalls dort stimuliert (Phenylephrin 10 µmol/l; PyrAp13 10⁻⁷ mol/l), für die SDS-PAGE aufgearbeitet und auf die entsprechenden Gele aufgetragen. Für die Western Blots wurden dort rabbit anti-ERK2 (rat) (Santa Cruz Biotechnology; 1:200) und rabbit anti-phospho-ERK1/2 (human) (Cell Signalling, Frankfurt a.M., Deutschland; 1:1000) eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter sheep anti-rabbit IgG Antikörper (Affinity Biologicals; Ancaster, Kanada; 1:1000). Nach Abschluss der Western Blots wurden hochauflösende Aufnahmen der Membranen angefertigt, welche anschließend selbst mit dem Freeware-Programm ImageJ (Version 1.43u) densitometrisch ausgewertet wurden. Mit dem Programm wurde dazu die Fläche unter den Intensitätskurven jeder einzelnen Bande ermittelt und zur weiteren Auswertung in ein Excel-Datenblatt transferiert. Zur Auswertung wurde anschließend für jede Probe das Verhältnis ihres ermittelten Intensitätswerts für das phosphorylierte ERK2 (p42p) jeweils zur Intensität der unphosphorylierten Bande des ERK2 (p42) bestimmt. Aus allen so ermittelten Werten wurde für die jeweiligen Kulturen und Behandlungsgruppen die entsprechenden Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung (S.E.M.) gebildet. Zur Untersuchung der ERK1/2-Aktivierung kamen dabei in der HZL-Kultur sieben bis neun Wells aus jeweils sechs Präparationen, für die entsprechende Analyse der HVL-Kultur vier bis fünf Wells aus vier Präparationen zur Auswertung. Für die Positivkontrolle der Kardiomyozyten wurden entsprechend vier Wells ausgewertet. Die statistische Evaluierung wurde anhand der Statistikfunktion des Programms Prism durch eine

einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) und dem post-hoc Test Newman-Keuls für die Kardiomyozyten und die HZL-Kultur durchgeführt. Zur entsprechenden Evaluation der HVL-Kultur wurde der Mann-Whitney U-Test zur statistischen Signifikanzanalyse eingesetzt. Für alle Analysen wurde ein minimales Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ verwendet.

7. RT-PCR

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Expression des APJ-Rezeptors und des Preproapelin jeweils auf mRNA-Ebene mittels *real time quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR) in den für die vorliegende Arbeit relevanten Nuclei des Hypothalamus (MnPO, PVN) sowie den daraus gewonnenen neuroglialen Primärkulturen nachzuweisen. MnPO- und PVN-spezifische Gewebeprobe wurden unmittelbar nach der Exzision aus den coronalen Gehirnschnitten neonataler Ratten (*siehe Kap. 1.1*) in ein Reaktionsgefäß überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Je nach Präparation wurden dafür die hypothalamischen Nuclei eines Tieres verwendet oder mehrerer Tiere „gepoolt“ (*siehe Tabelle 9*). Im Rahmen der RT-PCR Untersuchungen erfolgte lediglich die Lyse des Zellkulturmaterials am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie in Giessen (*siehe Kap. 7.2*)

7.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- RLT-Lysis-Puffer (Qiagen-79216)

Zugabe vor jeder Verwendung:

1 % β -Mercaptoethanol

7.2 Lysierung des Zellkulturmaterials

Alle Arbeitsschritte zur Lyse des Zellkulturmaterials wurden mit autoklaviertem Einmalmaterial unter einem Abzug durchgeführt, der zuvor mit 70 % Ethanol und mit RNase-Zap behandelt wurde. Vor Lyse der kultivierten Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Gläschen mit den Zellen von den Flexipermwänden abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber in 50 μl RLT-Lysis-Puffer je

Gläschen abgeschabt und lysiert. Das so gewonnene Lysat wurde mit einer Pipette in einer sterilen Spitze mehrmals auf- und abpipettiert, sowie in ebenfalls sterilisierte Reaktionsgefäße überführt und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Um einer möglicherweise nicht ausreichenden RNA-Menge in den Lysaten vorzubeugen, wurden auch hier einige Proben „gepoolt“ (siehe Tabelle 9). Dazu wurde die zuvor auf einem Gläschen zum Abschaben und Lysieren verwendete Menge an Lysispuffer abgenommen und für die gleiche Prozedur an einem oder mehreren weiteren Gläschen verwendet. Bis zur Verwendung wurden die tiefgefrorenen Proben bei -55 °C gelagert.

7.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den Gewebeproben und den Zellkulturlysaten sowie die nachfolgende RT-PCR zur Analyse der APJ- und Preproapelin-Expression wurden eigenständig in der Arbeitsgruppe von Dr. Paulus Wohlfahrt bei Sanofi-Aventis in Frankfurt (a.M.) unter Anleitung einer technischen Mitarbeiterin (A. Pall) durchgeführt. Alle Proben wurden dazu auf Eis zu Sanofi-Aventis Frankfurt transportiert. Alle anschließend durchgeführten Schritte fanden dort statt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach Herstellerangaben für RNeasy® Mini (Quiagen Handbuch, 2006) über spezielle Aufreinigungssäulen. Der RNA-Gehalt des Eluats wurde anhand eines Nanodropgeräts über die Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm und der daraus ermittelten Ratio bestimmt. Mögliche organische Kontaminationen des Eluats konnten durch die Ratio-Berechnung der Extinktionsmessung bei 260 und 230 nm ermittelt werden.

Tabelle 9: Liste der für die RT-PCR verwendeten Proben mit Probenbezeichnung, Art der Probe, Anzahl der „gepoolten“ Kulturgläschen (= Wells) bzw. der zur Erstellung der Kulturen präparierten Gewebestücke und RNA-Gehalt jeder Probe. Die Reihenfolge der Proben ist wie im Ergebnisteil (siehe Erg. Kap. II.3) dargestellt. MnPO = Nucleus praeopticus medianus; PVN = Nucleus paraventricularis hypothalami.

PCR-Bezeichnung	Probenart	Anzahl gepoolter Wells/Gewebestücke	RNA-Gehalt ng/µl
Ma	MnPO Gewebestücke adult	1	8,2
Mn	MnPO Gewebestücke neonatal	3	20,3
Mn	MnPO Gewebestücke neonatal	6	47,8
Mc	MnPO Primärzellkultur	7	1,8

Mc	MnPO Primärzellkultur	6	4,2
Pn	PVN Gewebestücke neonatal	2	47,3
Pn	PVN Gewebestücke neonatal	4	9,7
Pc	PVN Primärzellkultur	7	8,1
Pc	PVN Primärzellkultur	7	8,9

7.4 qRT-PCR zur Quantifizierung der APJ- und Apelin-spezifischer mRNA

Von den RNA-Extrakten der Proben wurden anschließend je nach RNA-Gehalt 1-2 µl zur gekoppelten cDNA Synthese und quantitativen PCR (qRT-PCR) mit TaqMan Primern (Applied Biosystems) zur Detektion von APJ- und Apelin-mRNA eingesetzt (Katalognummern GAPDH: Rn99999916_s1, APJ: Rn00580252_s1, Apelin: Rn00581093_m1). Enthielten die Proben zu wenig Ausgangs-RNA für die PCR, so wurde zuvor ein Präamplifikationsschritt anhand eines entsprechenden Kits durchgeführt.

Die Bestimmung der relativen Expression der Zielgene im Verhältnis zu Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als relativ konstant exprimiertem „house keeping gene“ wurde mit der Delta CT-Methode (Livak und Schmittgen, 2001) durchgeführt:

$$(1) \quad \Delta CT = \Delta C_{T \text{ GAPDH}} - \Delta C_{T \text{ Apelin/APJ}}$$

$$(2) \quad \text{Ratio} = 2^{-\Delta CT}$$

Dazu wurden die CT-Werte für Apelin oder APJ jeder Probe von dem jeweiligen Wert für GAPDH subtrahiert (Formel 1). Der so erhaltene Wert wurde anschließend als negativer Exponent zur Basis zwei gesetzt (Formel 2).

Als CT-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet man den Zeitpunkt bzw. Zyklus einer RT-PCR unmittelbar zu Beginn der Phase der exponentiellen Vervielfältigung eines Gens, in dem sich das Fluoreszenzsignal dieses Gens erstmals von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet bzw. einen gewählten Schwellenwert übersteigt. Der CT-Wert ist also ein Maß für die Anzahl an Kopien des untersuchten Gens vor Beginn der PCR in einer Probe. Durch die Normalisierung in Bezug auf ein oder mehrere Referenzgen(e) können dabei mögliche

methodisch bedingte Unterschiede bei der Gewinnung einzelner Proben ausgeglichen werden, was einen relativen Vergleich in Bezug auf die Kopienanzahl des untersuchten Gens ermöglicht.

8. Cytokinassays: IL-6 und TNF- α

Anhand dieser Assays sollte ein möglicher direkter oder indirekter Einfluss von PyrAp13 auf die LPS-induzierte Produktion der bioaktiven proinflammatorischen Cytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) untersucht werden. Um sowohl einen direkten als auch indirekten Einfluss von zentralem (i.c.v.) PyrAp13 auf die Produktion der Cytokine zu untersuchen, wurden die Blutplasma-proben des entsprechenden *in vivo* Versuchs in den Assays gemessen (*siehe Kap. 3.4.1*). Zusätzlich wurde, um einen möglichen direkten Effekt auf die Cytokinproduktion im Gehirn zu untersuchen, der Kulturüberstand der PVN- und MnPO-spezifischen neuroglialen Kulturen nach LPS-Stimulation mit und ohne zusätzlicher Stimulation mit PyrAp13 auf seinen Gehalt an IL-6 und TNF- α analysiert (*siehe Kap. 8.3*).

Zur Bestimmung der Konzentration an IL-6 und TNF- α sowohl im Blutplasma als auch in Zellkulturüberständen wurden entsprechende, am Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie bereits etablierte Bioassays durchgeführt (Wuchert et al., 2008; 2009). Der Gehalt an TNF- α wurde anhand des cytotoxischen Effekts des Cytokins auf Zellen einer murinen Fibrosarcoma-Zelllinie (WEHI 164 Subclon 13) bestimmt (Espevik und Nissen-Meyer, 1986). Die Werte für IL-6 wurden hingegen anhand der dosisabhängigen Wachstumsstimulation dieses Cytokins auf eine B9 Hybridoma-Zelllinie ermittelt (Lansdorp et al., 1986). Um diese zellulären Reaktionen quantitativ erfassen zu können, wurde die Substanz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in einem colorimetrischen Assay (MTT-Assay) verwendet. In diesem Assay benutzt man die nur in lebenden Zellen stattfindende Reduktion des gelblichen, wasserlöslichen Farbstoffes zu einem wasserunlöslichen violetten Formazankomplex (Mosmann, 1983). Ursprünglich vermutete man als hauptsächliche Ursache der Spaltung die Dehydrogenase-Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase vitaler Zellen. Neuere Erkenntnisse lassen jedoch eher auf eine Verstoffwechselung durch mikrosomale Enzyme schließen, welche reduzierte

Pyrimidinnucleotide benötigen (v.Berridge et al., 1996). Da die Farbreaktion nur in lebenden Zellen stattfindet, stellt die auftretende Farbreaktion somit ein quantifizierbares Maß für die Vitalität der Zellpopulation dar und kann mit einem ELISA-Reader bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm gemessen werden. Das Verfahren gilt als eine der Standardmethoden zur Bestimmung der Zellviabilität.

8.1 Der TNF- α Assay

8.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- Zellkultur-/Assaymedium (RMPI)

500 ml	RMPI
55 ml	FCS
250000 I.U.	Penicilin/Streptomycin
200 nmol/l	L-Glutamin
- TNF- α Standard (100pg/ml)
- Qualitätskontrollen (10 pg/ml; 25 pg/ml)
- MTT-Lösung

300 μ mol/l	MTT in PBS
-----------------	------------
- Isopropanol/HCl-Lösung

2 % (Vol)	2N HCl in Isopropanol
-----------	-----------------------

8.1.2 Methode und Assay-Durchführung

Zu Beginn des Assays wurden die für die Messung benötigten Zellen der murinen Fibrosarcoma-Zelllinie aus den für die Anzucht verwendeten Kulturflaschen anhand einer Trypsinbehandlung abgelöst. Anschließend wurde die so erhaltene Zellsuspension für 10 min bei 2300 U/min abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in frischem Anzuchtmedium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde darauf hin noch zweimal wiederholt. Danach wurde die erhaltene Suspension auf eine Zellzahl von 5×10^5 pro ml verdünnt und in sterile 96-Well-

Platten ausplattiert, welche anschließend zur Messung verwendet wurden. Durch die Zugabe des Cytostatikums Actinomycin D (4µg/ml) sollte weiteres Zellwachstum vermieden und eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber TNF- α erreicht werden. Sowohl die murinen TNF- α Standards und Qualitätskontrollen als auch die zu messenden Proben (Blutplasma bzw. Zellkulturüberstand) wurden in unterschiedlichen Verdünnungen in den Wells eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Std. im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) wurden in jedes zu messende Well der Platte 25 µl der MTT-Lösung pipettiert. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubationsphase für vier Std. bei 37 °C im Inkubator. Danach wurden jeweils 125 µl Flüssigkeit pro Well abgenommen und durch 100 µl der Isopropanol/HCl-Lösung ersetzt, wodurch eine zelluläre Auswaschung der wasserunlöslichen Formazankristalle bedingt werden sollte. Nach einer weiteren, lichtgeschützt durchgeführten, Inkubationszeit von 12 Std. bei Raumtemperatur, wurde die 96-Well-Platte zur Detektion bei einer Wellenlänge von 550 nm in den ELISA-Reader eingesetzt.

Um die entsprechenden Konzentrationen des Cytokins TNF- α bzw. IL-6 in den jeweiligen Proben zu bestimmen zu können, wurde zunächst eine Eichkurve anhand der Standards erstellt. Hierfür wurden die gemessenen OD-Werte gegen die logarithmierte TNF- α Konzentration aufgetragen (*Abbildung 20B*). Im linearen Bereich dieses Graphs ergab sich somit eine direkte Proportionalität der beiden Parameter, und ausschließlich Messungen in diesem Bereich konnten zur Auswertung der Cytokinkonzentration herangezogen werden. Über den Verdünnungsfaktor der Proben und die Gleichung der jeweiligen Regressionsgeraden (*Abbildung 20*) konnten schließlich die zu ermittelnden Konzentrationen bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Verdünnungen der Proben lag die Nachweisgrenze für TNF- α in diesem Assay bei 6 pg/ml (Ross et al., 2003).

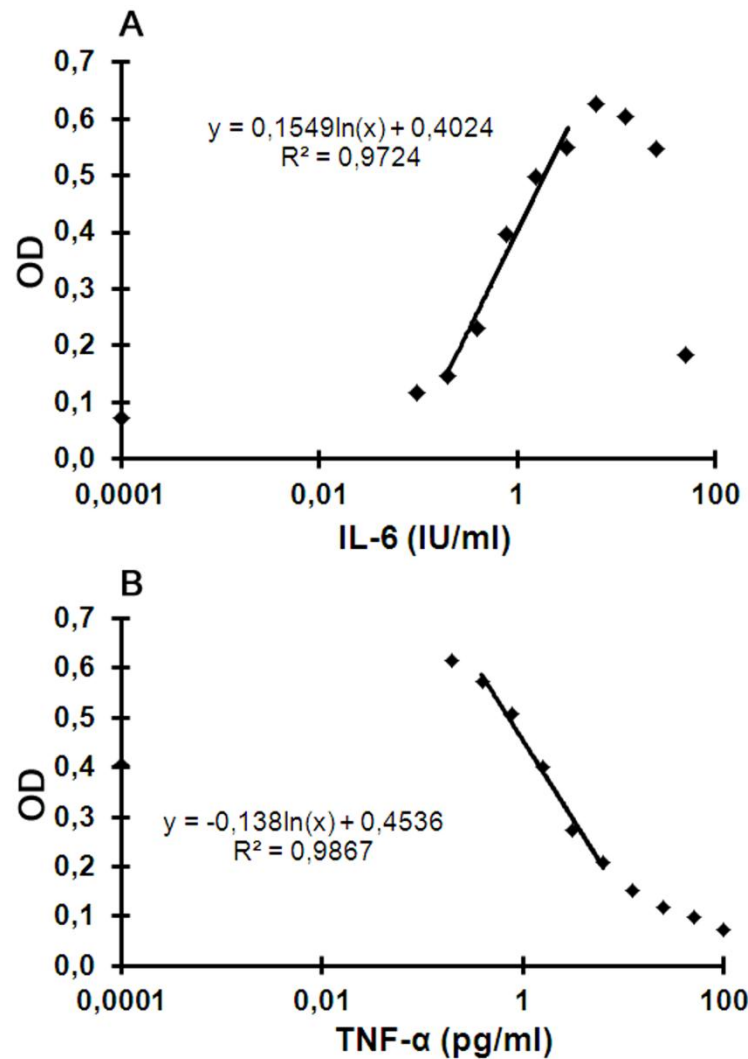


Abbildung 20: Standardkurven mit Gleichungen der entsprechenden Ausgleichsgeraden zur quantitativen Bestimmung der bioaktiven Cytokine IL-6 (A) und TNF-α (B).

Semilogarithmische Auftragung der jeweiligen Cytokinkonzentration in den Standards gegen die bei 550 nm bestimmte optische Dichte (OD) nach Markierung der Zelllinien mit MTT=3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-bromid. Die Geraden geben den linearen Bereich der direkten Proportionalität zwischen der Cytokinkonzentration und der photometrischen Messung an. R^2 = Korrelationskoeffizient

8.2 Der IL-6 Assay

8.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

- Zellkulturmedium

45 ml	RMPI
4 ml	FCS
650 µg	Gentamycin
200 nmol/l	Glutamin
200 nmol/l	Mercaptoethanol
10 I.U./ml	Rekombinantes menschliches IL-6
- Assaymedium (wie Zellkulturmedium ohne IL-6)
- IL-6 Standard (100 I.U./ml)
- Qualitätskontrollen (10 I.U./ml; 25 I.U./ml)

- MTT-Lösung
300 µmol/l in PBS
- Isopropanol/HCl-Lösung
2 % (Vol) 2N HCl in Isopropanol

8.2.2 Assay-Durchführung

Die Durchführung dieses Assays erfolgte anfangs wie für den TNF- α Assay beschrieben (siehe Kap. 8.1.2) mit der Ausnahme, dass die B9-Hybridomazellen zu Beginn mit Assaymedium gewaschen wurden und anschließend kein Actinomycin D zugesetzt wurde. Die Bestimmung von IL-6 in den Proben erfolgte ebenfalls in sterilen 96-Well-Platten. Wie für den TNF- α Assay wurden die Standards, die Qualitätskontrollen und die zu messenden Proben, und in der entsprechenden Vorverdünnung den Wells zugegeben. Der erste Inkubationszeitraum betrug hier jedoch im Gegensatz zum TNF- α Assay 72 Std. Alle weiteren Schritte wurden in beiden Protokollen gleich durchgeführt. Das heißt, die Messung der Proben erfolgte anschließend ebenfalls im ELISA-Reader bei 550 nm. Auch die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte wie für TNF- α beschrieben (Kap. 8.1.2). Für diesen Assay betrug die Detektionsgrenze, ebenfalls unter Berücksichtigung der Verdünnungen, 3 I.U. pro ml (Ross et al., 2003).

8.3 Messung der bioaktiven Cytokine IL-6 und TNF- α im Überstand der neuroglialen PVN und MnPO-Kulturen

Aufgrund der Ergebnisse der *in vivo* Versuche (siehe Erg. Kap. V.1) sollte in diesem Experiment ein möglicher Einfluss von PyrAp13 *in vitro* auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Produktion von bioaktiven Cytokinen in den neuroglialen PVN- und MnPO-Primärkulturen untersucht werden. Dazu wurden nach Stimulation der Primärkulturen mit LPS (100 µg/ml) die Konzentration von bioaktivem IL-6 und TNF- α im Überstand der Kulturen anhand der entsprechenden Assays bestimmt (siehe oben). Alle durchgeführten Arbeiten wurden bei sterilen Bedingungen unter der *Laminar Flow* durchgeführt. Unmittelbar vor Beginn der LPS-Stimulation wurde das Kulturmedium der Kulturen in den Mikrokammern durch jeweils 350 µl frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Neurobasal A (NBA)

ersetzt. Dies geschah, um eine mögliche Beeinflussung der Messergebnisse durch während der normalen Kulturbedingungen im Überstand nach einer Dauer von 1-2 Tagen ohne Mediumwechsel akkumulierte Cytokine zu vermeiden. Anschließend wurden die Stimulantien je nach Versuchsgruppe (LPS, LPS+PyrAp13, Kontrolle) in frischem, ebenfalls vorgewärmtem NBA-Medium angesetzt, dann das zuvor gewechselte Medium durch ein Pumpensystem mit einer sterilen Glaspasteurpipette abgesaugt und jeweils 350 µl der vorbereiteten Lösungen in die Kammern gegeben. PyrAp13 wurde in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l und LPS in einer Konzentration von 100 µg/ml für diese Versuche verwendet. Da die verwendeten PyrAp13 Aliquots in Ca^{2+} -Meßpuffer angesetzt waren, wurde als Kontrollgruppe Ca^{2+} -Meßpuffer, 1:100 in NBA verdünnt, verwendet. Die Entnahme der Kulturüberstände fand 0, 30, 60, 90 und 120 min nach Beginn der *in vitro* Stimulation statt. Bis zum Einsatz in den Assays wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

8.4 Evaluation der Cytokindaten

Die aus dem Serum der Ratten (*siehe Kap. 3.4.2*) gewonnen Cytokindaten wurden für jede Versuchsgruppe gemittelt und der entsprechende Standardfehler (S.E.M.) ermittelt ($n = 5-6$). Zur statistischen Evaluierung der Daten mussten diese zunächst logarithmiert werden. Anschließend wurden sie anhand der Statistikfunktion des Programms Prism einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One-way ANOVA) und dem post-hoc Test Newman-Keuls auf statistische Unterschiede zwischen den Gruppen hin untersucht. Unterschiede zwischen den LPS-Versuchsgruppen und den Kontrollen wurden für die IL-6 Werte mit einem $p \leq 0,05$ (#/*), $p \leq 0,01$ (##/**) und $p \leq 0,001$ (###/***) als signifikant erachtet. Bei den TNF- α Werten wurden entsprechende Unterschiede zwischen den beiden LPS-Gruppen mit $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen. Auch die Messdaten der neuroglialen Zellkulturen (*Kap. 8.3*) wurden zunächst für jede Behandlung gemittelt und der entsprechende Standardfehler (S.E.M.) ermittelt ($n_{\text{PVN}} = 5-11$; $n_{\text{MnPO}} = 4-7$). Die Daten wurden aus neuen Präparationen der PVN-spezifischen und sechs der MnPO-spezifischen Kultur gewonnen. Zur statistischen Evaluation der Messdaten der neuroglialen Zellkulturen war hingegen ein Logarithmieren der Daten wie bei den Plasmawerten aufgrund einer kleineren Streuung dieser Messwerte nicht notwendig. Die drei Versuchsgruppen wurden ebenfalls mit der Statistikfunktion des Programms Prism, der One-way ANOVA und dem post-hoc Test Newman-Keuls auf statistische Unterschiede hin untersucht. Dabei wurde ebenfalls ein $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) gegenüber der Kontrolle als signifikant erachtet.

C. Ergebnisse

I. Immunhistochemie für Apelinpeptide im Zentralnervensystem der Ratte

1. Apelin17

Für den immunhistochemischen Nachweis des Apelin17 (H-KFRRQRPRLSHKGPMPPF-OH) in coronalen Gehirnschnitten zweier Ratten wurde das für Apelin17-spezifische Antiserum (rabbit-anti mouse) in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Die Aminosäuresequenz von Apelin17 ist identisch für Mensch, Rind, Maus und Ratte (Tatemoto et al., 1998; Hosoya et al., 2000; Lee et al., 2000). Die Apelin17-spezifischen Immunfluoreszenzsignale waren dabei hauptsächlich auf die zellulären Strukturen weniger Nuclei des Hypothalamus sowie des Thalamus beschränkt (*Abbildung 21*). Der immunhistochemische Nachweis für Apelin17 in neuronalen Faserstrukturen (Axone bzw. Dendriten) bzw. Punctata (Synapsen, Spinas, Varikositäten) konnte nur vereinzelt demonstriert werden. Eindeutig positive Immunreaktivität (IR) für Apelin17 konnte in Zellkörpern des *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus (PVN), und dabei vor allem in dessen magnozellulärer Substruktur (PaLM), dargestellt werden (*Abbildung 21A*). Eine ebenfalls ausgeprägte Markierung zeigte sich in den Epithelzellen des im dritten Ventrikel gelegenen *Plexus choroideus* sowie dem zum limbischen System gehörenden Subnucleus der *Stria Terminalis*, der im angelsächsischen Sprachgebrauch als *Bed Nucleus* der *Stria Terminalis* bezeichnet wird (*Abbildung 21B+E*). Bei Letzterem handelte es sich um den posterioren Teil der lateralen Division dieses Nucleus.

2. Apelin13

Apelin13 und die pyroglutamylierte Form des Peptids (PyrAp13) sind die am häufigsten untersuchten Apelinfragmente, die endogen gebildet werden und als die potentesten Aktivatoren des APJ-Rezeptors in transfizierten Zelllinien beschrieben wurden (Tatemoto et al., 1998; Habata et al., 1999; Kawamata et al., 2001; Medhurst et al., 2003). Deshalb wurden Apelin13 (Ap13) bzw. [Pyr¹]Apelin13 (PyrAp13) in den Experimenten der vorliegenden

Arbeit verwendet, und die Verteilung seiner cerebralen Immunfluoreszenzmarkierung ausführlicher untersucht als die von Apelin17.

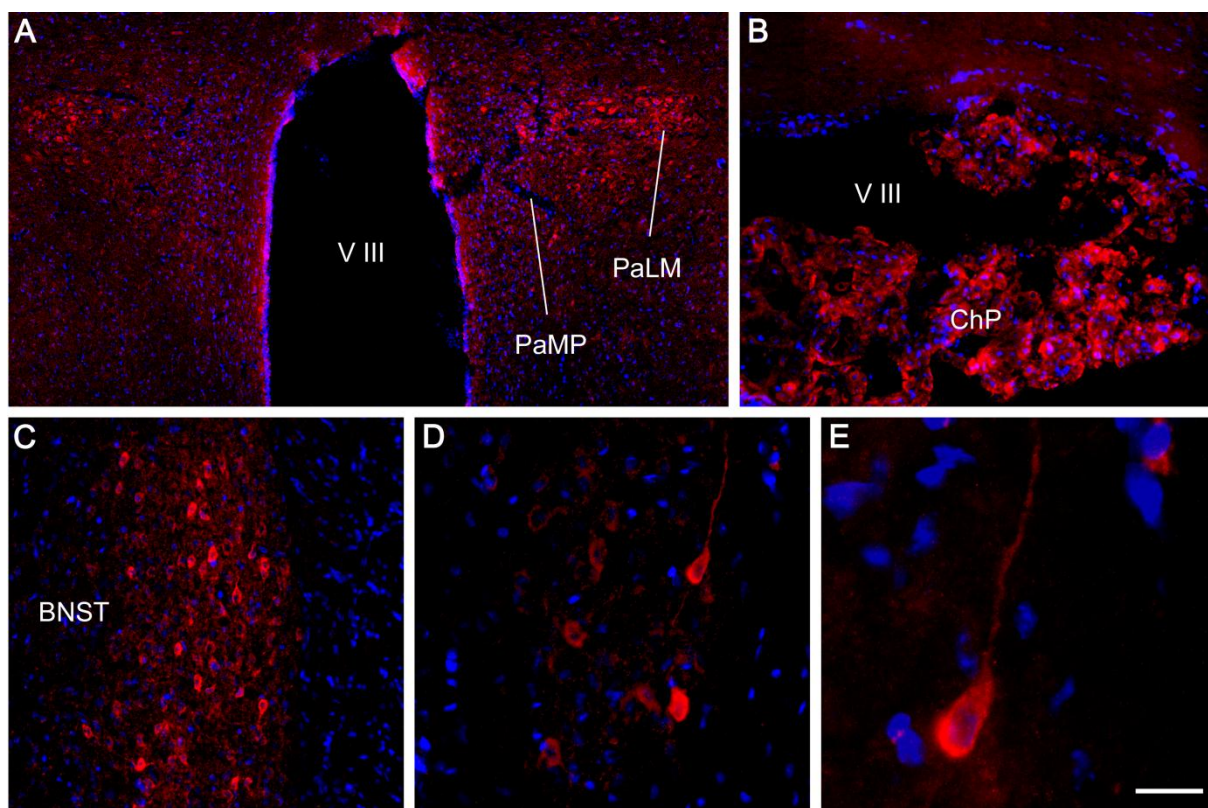


Abbildung 21: Immunhistochemische Markierungen für Apelin17 an Gewebeschnitten des Rattengehirns.

Nachweis der Apelin17 Expression durch Markierung mit polyclonalem rabbit anti-Apelin17 als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem (rot) donkey anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI (blau). (A) Übersichtsaufnahme des Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) mit starker Immunreaktivität (IR) für Apelin17 in Neuronen des magnozellularen (PaLM) sowie parvoczellulären (PaMP) Bereichs; V III = 3. Ventrikel (B) Apelin17-IR in Epithelzellen des Plexus choroideus (ChP) (C) Ausgeprägte IR für Apelin17 in zahlreichen Neuronen des posterioren Teils der lateralen Division des Nucleus der Stria terminalis (STLD) (D) höher und (E) hochauflösende Aufnahmen einzelner Apelin17-positiver Zellen im STLD; Größenmarker: A: 100 μm ; B+C: 50 μm ; D: 25 μm ; E: 10 μm

Die Ap-13-Immunreaktivität zeigte ebenfalls ein auf bestimmte neurogliale Strukturen des Hypothalamus beschränktes Verteilungsmuster mit wenigen Apelin13-positiven Faserstrukturen. Stattdessen überwogen Apelin13 immunopositive Signale im Bereich neuronaler Perikaryen einiger hypothalamischer Nuclei sowie in glandulären Zellen der Hypophyse, Epithelzellen des *Plexus choroideus* und offensichtlich in Endothelzellen cerebraler Blutgefäße.

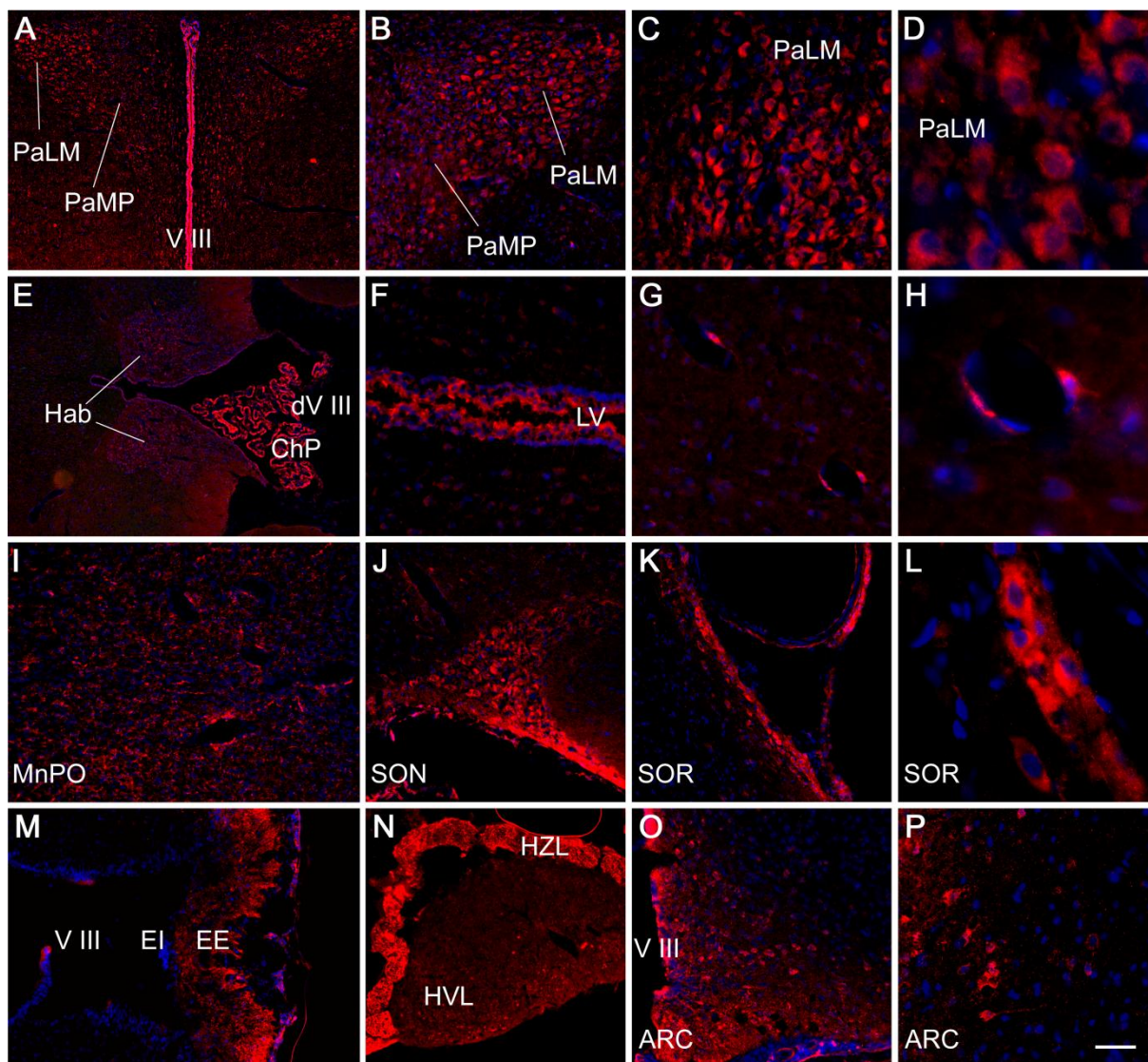


Abbildung 22: Immunhistochemische Markierungen an coronalen Gewebeschnitten des Rattengehirns für Apelin13 (Ap13).

Nachweis der Ap13-Expression durch Markierung mit polyclonalem rabbit anti-Ap12 als Primärantikörper, biotinyliertem anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper und Cy3-gekoppeltem Streptavidin (rot). Markierung aller Zellkerne mit DAPI (blau). (A) Übersichtsaufnahme Ap13-positiver Neurone im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (PVN) mit deutlicher Immunreaktivität (IR) in Ependymzellen der Wand des dritten Ventrikels (V III). (B) IR für Ap13 im parvo- (PaMP) und magnozellular (PaLM) Subnucleus des PVN. (C+D) Ap13-positive Zellen im PaLM. (E) Ap13-immunpositive Epithelzellen im Plexus choroideus (ChP) des dorsalen dritten Ventrikels (dV III) und Markierung einzelner Neurone der Habenula (Hab). (F) Immunfluoreszenz für Ap13 in Ependymzellen des lateralen Ventrikels (LV) und (G+H) Endothelzellen größerer Blutgefäße im Bereich des Hypothalamus. (I) Ap13-IR in Faserstrukturen der medianen präoptischen Region (MnPO), (J) in Zellen des Nucleus supraopticus (SON) und (K+L) des rostralen Bereichs des SON (SOR). (M) IR für Ap13 in der Zona externa der Eminentia mediana (EE), ohne Ap13-IR in der Zona interna (EI) der Struktur. (N) Markante Ap13-Expression in glandulären Zellen des Zwischenlappens (HZL) sowie vereinzelt Zellen des Vorderlappens der Hypophyse (HVL). (O+P) Ap13-positive Zellen im Nucleus arcuatus (ARC). Größenmarker: A,E,N: 100µm; B,I,J,K,M,O: 50µm; C,F,G,P: 25µm und D,H,L: 10µm

Im Hypothalamus wurde speziell im Bereich des magno- und parvozellulären PVN eine starke Immunreaktivität von Apelin13-positiven Zellkörpern nachgewiesen (*Abbildung 22A-D*). Ebenfalls immunpositiv für Apelin13 zeigten sich zahlreiche Neurone des magnozellularären *Nucleus supraopticus* (SON) inklusive seiner rostralateralen Komponente (SOR). Im *Nucleus arcuatus* (ARC) konnte eine ausgeprägte Immunreaktivität in einzelnen Zellen festgestellt werden (*Abbildung 22O+P*). Weiterhin konnte in den Epithelzellen des *Plexus choroideus*, den Ependymzellen des dritten Ventrikels und einzelnen Endothelzellen größerer Blutgefäße eine ausgeprägte Immunfluoreszenz für Apelin13 beobachtet werden (*Abbildung 22E-H*). Für die an der Basis des Hypothalamus lokalisierte *Eminentia mediana* konnte eine Apelin13 immunreaktive Markierung zahlreicher Fasern (Axone) in der *Zona externa* gezeigt werden (*Abbildung 22M*).

Im Gegensatz dazu konnten im *Nucleus praeopticus medialis* (MPO) und im *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) Apelin13-positive Faserstrukturen, jedoch keine Zellkörper nachgewiesen werden. Das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der *Nucleus paraventricularis thalami* (PVA) wiesen bei den durchgeführten Markierungen hingegen nur sehr wenige Faserstrukturen und keine Apelin13-immunreaktive Zellen auf.

In Teilen der Hypophyse konnte, wie schon erwähnt, ein sehr stark ausgeprägtes Immunfluoreszenzsignal für Apelin13 demonstriert werden. Besonders markant war dies in den glandulären Zellen des Hypophysenzwischenlappens (HZL), während sich im Vorderlappen der Hypophyse (HVL) nur einzelne Zellen als Apelin13-immunreaktiv erwiesen (*Abbildung 22N*). In den neuronalen Axonen und Pituizyten des Hinterlappens (HHL) konnte dagegen keine entsprechende Immunmarkierung beobachtet werden.

3. Vergleich der Apelinexpression in Wistar- und Sprague Dawley

De Mota et al. (2004) berichteten von einer erhöhten Konzentration an Apelin im Hypothalamus von Sprague-Dawley ($18,0 \pm 4,9$ pmol/g Gewebe) verglichen mit Wistar ($3,2 \pm 0,7$ pmol/g Gewebe) Ratten. Um dies zu untersuchen, wurden die eben vorgestellten immunhistochemischen Markierungen für Apelin13 und Apelin17 an Gefriergewebeschnitten jeweils eines Tieres der beiden Stämme durchgeführt. Die Gewebeschnitte beider Tiere zeigten jedoch in der mikroskopischen Analyse der jeweils untersuchten Gehirnstrukturen

vergleichbar intensive Immunreaktivitäten für beide Apelinfragmente. Somit konnte anhand dieser Methode das Ergebnis von De Mota et al. (2004) nicht bestätigt werden.

II. Immunhistochemischer Nachweis des APJ-Rezeptors

Zur Verteilung des Apelins in hypothalamischen Strukturen und Nuclei existieren zahlreiche Publikationen sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2001; Brailoiu et al., 2002; Reaux et al., 2002; Medhurst et al., 2003; De Mota et al., 2004). Für den Apelin-Rezeptor (APJ) hingegen basieren diese, soweit vorhanden, nur auf mRNA Daten (De Mota et al., 2000; Hosoya et al., 2000; Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; Reaux et al., 2001; Medhurst et al., 2003). Daher fehlt bis *dato* eine detaillierte immunhistochemische Kartierung des APJ-Rezeptorproteins im Hypothalamus und Thalamus der Ratte und stellt somit eines der Ziele der vorliegenden Arbeit dar. Nachfolgende Ergebnisse sollten zunächst die Spezifität des für die Durchführung der Kartierung benutzen Antikörpers validieren. Darüber hinaus sollte das APJ-Protein per Western Blot Analyse und APJ-spezifischer Immunfluoreszenz in Zellen der Hypophyse nachgewiesen werden. In den zum intrazellulären Calcium-Imaging herangezogenen Primärkulturen des PVN sowie MnPO (*siehe MM Kap. 1.1*) sollte mittels RT-PCR die Expression der APJ-spezifischen mRNA aufgezeigt werden.

1. Validierung der Antigenspezifität des APJ-spezifischen Antikörpers

Für die meisten der im Folgenden dargestellten Ergebnisse kam ein im Kaninchen gegen eine N-terminale Teilsequenz (CTIAGHFRKERIEGLRK) des rattenspezifischen APJ Proteins generiertes, polyclonales Antiserum [rabbit anti-rat APJ (APJ-R)] zum Einsatz. Dies geschah sowohl an Gefriergewebeschnitten des Gehirns als auch in den primären Kulturzellen des HZLs der Ratte. Eine Möglichkeit, die Spezifität der Antigenmarkierung zu überprüfen, stellt die Co-Markierung mit einem zweiten Antikörper/-serum gegen ein anderes Epitop des entsprechenden Antigens dar. Zu diesem Zweck erfolgte eine Doppelmarkierung mit einem in der Ziege gegen die Aminosäuresequenz einer cytoplasmatischen Domäne im C-terminalen Teil des humanspezifischen APJ Proteins generierten, polyclonalen Antiserum [goat anti-

human APJ (APJ-G)] (*Kap. 1.1*). In der Primärkultur der HZL-Zellen wurde zusätzlich eine Doppelmarkierung mit zwei unterschiedlichen nNOS-spezifischen Antikörpern, ebenfalls aufgrund der späteren Verwendung in histo- bzw. cytochemischen Markierungen, durchgeführt. Durch die Evaluierung der Anzahl an doppelmarkierten Zellen konnten so Rückschlüsse auf die Spezifität der Antikörper gezogen werden (*Kap. 1.2*). Zusätzlich dazu wurde die möglicherweise verbleibende, unspezifische Bindungskapazität des APJ-R in Strukturen immunhistochemisch markierter Gewebeschnitte des Rattengehirns nach vorheriger Inkubation des Antikörpers mit dem entsprechenden Antigen bestimmt (*Kap. 1.3*).

1.1 Immunhistologische Immunfluoreszenzmarkierung für APJ im Gehirnschnitt der Ratte

In *Abbildung 23* ist exemplarisch eine APJ-spezifische Doppelmarkierung mit beiden Antikörpern an Gewebeschnitten im Bereich des *Nucleus arcuatus* dargestellt. Die Detektion mit dem APJ-G Antikörper (*Abbildung 23A*) ergab dabei, verglichen mit dem APJ-R Antikörper (*Abbildung 23B*), eine erhöhte unspezifische Hintergrundmarkierung des Gewebes.

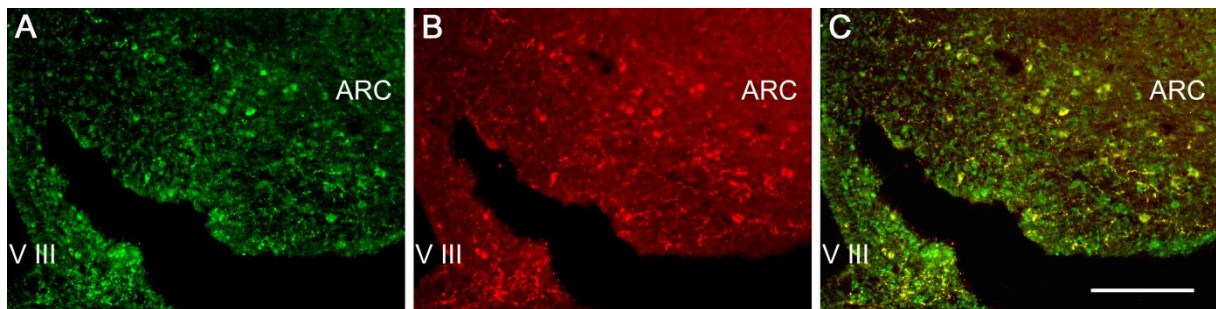


Abbildung 23: Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen für APJ Expression im Bereich des Nucleus arcuatus (ARC) der Ratte.

APJ-Immunreaktivität von Fasern und Perikaryen in immunhistochemisch markierten Gehirngewebeschnitten im Bereich des am dritten Ventrikel (V III) gelegenen ARC. Nachweis der APJ-Expression durch Markierung des gleichen Gewebeschnitts mit (A) polyclonalem goat anti-human APJ bzw. (B) rabbit anti-rat APJ als Primärantikörper und Alexa488 donkey anti-goat bzw. Cy3-gekoppeltem donkey anti-rabbit als Sekundärantikörper. (C) Überlagerungsbild der beiden Aufnahmen. Größenmarker: 100 μ m

Das Überlagerungsbild der beiden Markierungen (*Abbildung 23C*) zeigt jedoch, ersichtlich an der durch die Überlagerung der beiden Einzelsignale gelben Farbe, dass ein Großteil der durch APJ-R detektierten Nervenzellen ebenfalls durch die Verwendung des APJ-G Antikörpers markiert wurde. Dabei handelte es sich sowohl um Faserstrukturen als auch um Zellkörper immunreaktiver Neurone.

1.2 Immuncytochemische Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung für APJ in der HZL-Primärkultur

Für die Studien an der primären HZL-Kultur wurden nach der Präparation die gewonnenen Zellen in einer Dichte von $8,8 \times 10^5$ Zellen pro Mikrokulturkammer (= 28 mm² Fläche) ausplattiert, um eine für die immuncytochemischen Doppelmarkierungen optimale Zelldichte nach einer Differenzierungszeit von 7-9 Tagen zu erreichen. Sowohl nach immuncytochemischer Markierung mit APJ-R als auch APJ-G erwiesen sich teils vereinzelt liegende, teils gruppierte HZL-Zellen als ausgeprägt immunpositiv, wobei die Anzahl unmarkierter Zellen jeweils überwog (*Abbildung 24*). Als Anzeichen einer „spezifischen“ Bindung an das entsprechende Antigen kann jedoch lediglich der Nachweis einer Co-Lokalisation und nicht Co-Distribution zellulärer Immunfluoreszenzsignale bei Einsatz zweier unterschiedlicher Antikörper/-seren gewertet werden. Aus den Überlagerungsbildern (*Abbildung 24C, F, I*) beider Immunmarkierungen wird deutlich, dass beide Antikörper jeweils die gleichen Zellen markierten. Bei höherer Vergrößerung konnte darüber hinaus klar dargestellt werden, dass beide Antikörper nach sekundärer Fluorophormarkierung sogar ein vergleichbares intrazelluläres und membranständiges Verteilungsmuster des APJ Proteins nachwiesen (*Abbildung 24G-I*). Allgemein war anzumerken, dass die Immunreaktivität des APJ-G trotz einer höheren molaren Konzentration (1:500) im Vergleich zu derjenigen für APJ-R (1:1000) stets etwas schwächer ausfiel.

Die quantitative Auswertung der mit beiden APJ-spezifischen Antikörpern durchgeführten immuncytochemischen Markierungen ist in *Abbildung 25A* dargestellt. Dabei belief sich der prozentuale Anteil APJ immunpositiver Zellen an der Gesamtpopulation HZL-spezifischer Primärkulturzellen bei der Verwendung der Antikörper APJ-G bzw. APJ-R auf $26,7 \pm 3,7$ % respektive $24,1 \pm 5,2$ %. Der Anteil der mit APJ-R- und APJ-G co-markierten Zellen an der

Population der APJ-R-immunreaktiven Zellen war $98,4 \pm 0,50 \%$. Der Anteil der co-markierten Zellen an der Population der APJ-G immunpositiven Zellen war $84,7 \pm 18,5 \%$. Nur eine kleine Population der HZL-Zellen war somit APJ-G, aber nicht APJ-R immunreaktiv. Deshalb konnte von einer hohen Übereinstimmung der APJ-G- und der APJ-R-spezifischen Immunmarkierungen ausgegangen werden.

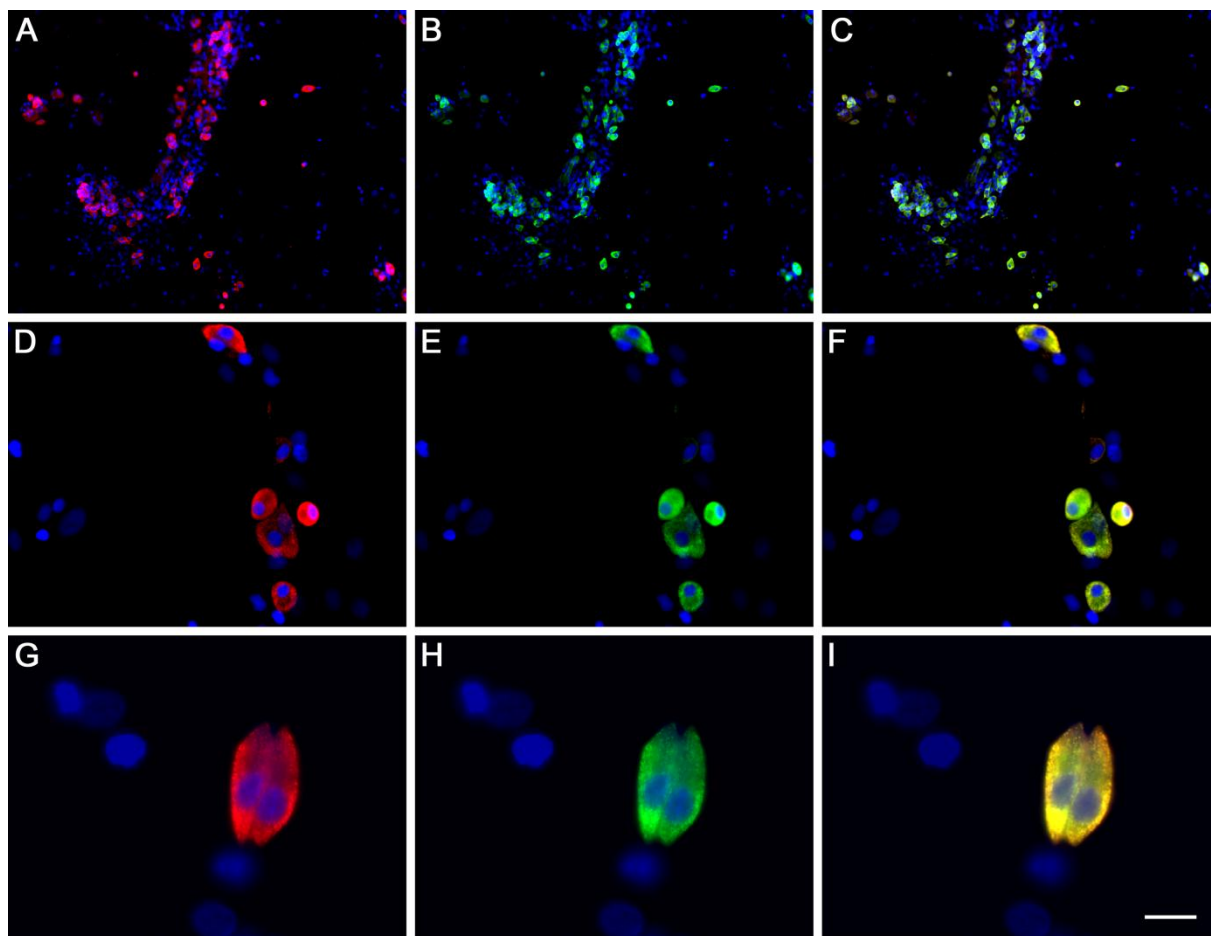


Abbildung 24: Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung für die APJ-Expression in primär kultivierten Hypophysenzwischenlappenzellen (HZL).

(A-C) Übersichtsaufnahmen sowie (D-I) Darstellung einzelner HZL-Zellen nach APJ-Immunmarkierung mit dem (A, D, G) APJ-G bzw. (B, E, H) APJ-R Antikörper. Indirekter Immunfluoreszenz Nachweis durch Verwendung von Cy3-gekoppeltem (rot) donkey anti-goat IgG sowie Alexa488 (grün) gekoppeltem donkey anti-rat IgG als jeweiligem Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI (blau). C, F und I repräsentieren die jeweiligen Überlagerungen beider Immunmarkierungen. Größenmarker: A-C: 100 μm ; D-F: 25 μm und G-I: 10 μm

Für einige immunhisto- und -cytochemische Markierungen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene NOS-spezifische Antikörper eingesetzt [rabbit anti-rat nNOS (nNOS-R) und

mouse anti-human NOS (nNOS-M)]. Dazu zählten die immunhistochemischen Untersuchungen zur Co-Lokalisation und -Distribution von nNOS und APJ in hypothalamischen Gewebeschnitten (*Kap. III.1*) und die cytochemische Überprüfung für nNOS der im Ca^{2+} -Imaging untersuchten neuroglialen Zellen des PVN und MnPO (*Kap. IV.2*). Deshalb wurden mit diesen beiden Antikörpern ebenfalls entsprechende Doppelmarkierungen an der HZL-Kultur durchgeführt. Die Auswertung der Immunmarkierungen für beide nNOS-spezifischen Antikörper ergab im Gegensatz zu derjenigen für APJ leicht unterschiedliche Resultate (nNOS-R: $23,6 \pm 3,5$ %; nNOS-M: $14,9 \pm 6,7$ %) (*Abbildung 25B*). Auch bei den Relationen doppelmarkierter HZL-Zellen zur Gesamtzahl entweder mit nNOS-M oder nNOS-R immunpositiv markierter Zellen, und somit der Übereinstimmung der Markierungen für beide Antikörper, ergab sich eine größere Diskrepanz der beiden Werte (co-lokalisiert/nNOS-M: $83,93 \pm 7,33$ %; co-lokalisiert/nNOS-R: $58,51 \pm 17,12$ %). In Analogie zum Vergleich der beiden APJ-Antikörper war deshalb bei Verwendung dieser beiden Antikörper von einer größeren Zell-Population auszugehen, welche nur von nNOS-R erkannt wurde.

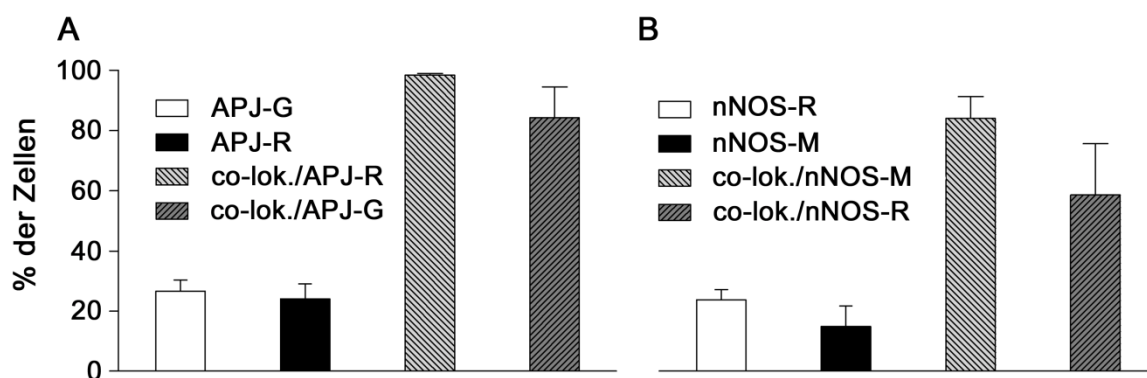


Abbildung 25: Quantitative Auswertung immuncytochemischer Doppelmarkierungen mit jeweils zwei unterschiedlichen Antikörpern für APJ und neuronale NO-Synthase (nNOS) an Zellen der primären Hypophysenzwischenlappenkultur (HZL) der Ratte.

Ausgezählt wurden in vier Präparationen je 4-6 mikroskopisch vergrößerte ($\times 20$), randomisiert aufgenommene Fotografien immuncytochemischer Fluoreszenzmarkierungen der HZL-Kultur und nNOS. (A) Darstellung des prozentualen Anteils APJ immunpositiver Zellen an der Gesamtzellzahl der ausgewerteten HZL-Zellen nach Markierung mit APJ-G (=goat anti-human APJ) und APJ-R (=rabbit anti-rat APJ) und der Verhältnisse der co-lokalisierten Zellen (co-lok.) zu der Anzahl an APJ-G- bzw. APJ-R-positiven Zellen. (B) Prozentualer Anteil nNOS immunpositiver Zellen an der Gesamtzahl der ausgewerteten HZL-Zellen nach Markierung mit nNOS-R (rabbit anti-rat nNOS) und nNOS-M (mouse anti-human nNOS) und entsprechender Verhältnisse der co-lokalisierten Zellen zu der Anzahl an nNOS-R- bzw. nNOS-M-immunpositiven Zellen.

1.3 Kontrollrecherche zur Antigenpezifität des APJ-R Antikörpers

Ziel dieses Versuches war es, die spezifische Bindungsaktivität des APJ-R Antikörpers für sein Antigen im Gehirnschnitt zu untersuchen. Dazu wurde eine Serie der Gehirnschnitte nach dem Protokoll zur immunhistochemischen Markierung (*siehe MM Kap. 4.2*) in Gegenwart von APJ-R prozessiert. Eine zweite Schnittserie mit seriell alternierenden, coronalen Gehirnschnitten wurde mit APJ-R Antiserum behandelt, welches zuvor in Gegenwart eines Blockingpeptids mit der Antigensequenz des Antikörpers (CTIAGHFRKERIEGLRK) vorinkubiert wurde.

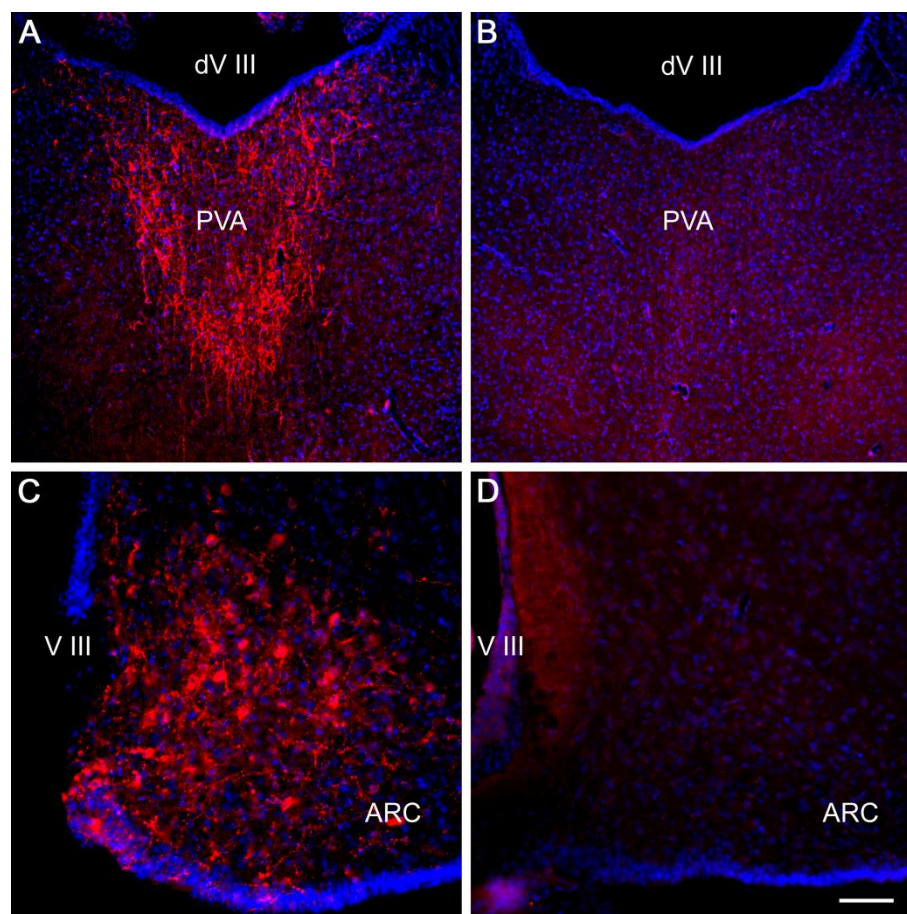


Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Darstellung des Apelinrezeptors APJ in coronalen Gehirnschnitten der Ratte für APJ nach Antigen-Absättigung des Antikörpers.

Nachweis der APJ-Expression durch Markierung mit polyclonalem rabbit anti-rAPJ Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem (rot) donkey anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI (blau). APJ-immunreaktive Faserstrukturen im Bereich des Nucleus paraventricularis thalami (PVA) sowie Faserstrukturen und Perikaryen im Bereich des medialen Nucleus arcuatus (ARC) nach Inkubation mit APJ-R Antiserum ohne (A,C) bzw. nach (B,D) vorhergehender Absättigung mit dem entsprechenden peptidergen Antigen (CTIAGHFRKERIEGLRK). V III = 3. Ventrikel, dV III dorsaler 3. Ventrikel; Größensmarker: A+B: 100µm, B+D: 50 µm

In allen untersuchten Strukturen der zwei Schnittserien war im Vergleich zu der Markierung mit dem unbehandelten Antiserum keine entsprechende Immunreaktivität mehr zu beobachten. Exemplarische Aufnahmen dieses Versuchs sind in *Abbildung 26* dargestellt und zeigen eine komplette Suppression der rAPJ-spezifischen Immunreaktion in den dendritischen bzw. axonalen Nervenzellfortsätzen sowie Punctata im Bereich des *Nucleus paraventricularis thalami* (PVA) (*Abbildung 26 A+B*) sowie in Perikaryen und Fasern des *Nucleus arcuatus* (ARC) (*Abbildung 26C+D*). Auch in weiteren, hier nicht dargestellten Strukturen, wie zum Beispiel PVN, SON und MnPO, ließ sich durch die Absättigung des APJ-R keine immunhistochemische Markierung mehr detektieren.

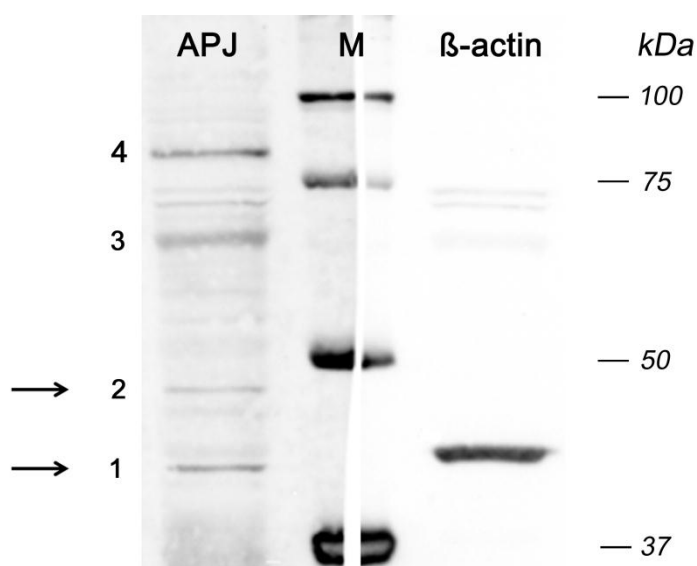


Abbildung 27: Western Blot Analyse für die APJ-Expression im Hypophysenzwischenlappen (HZL) der Ratte.

Nachweis der APJ-Expression durch Western Blot Analyse anhand von Markierung mit rabbit anti-rAPJ (APJ-R) als Primärantikörper und HRP-gekoppeltem anti-rabbit IgG. Detektion von β-Actin anhand von rabbit anti-β-Actin als Primärantikörper und ebenfalls HRP-gekoppeltem anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Marker (M): Precision Plus Protein Western C-Standard Sample. Die durch APJ-R erhaltenen Banden sind durch Zahlen (1-4) markiert, die Banden mit einer für APJ zu erwartenden Molekülmasse zusätzlich mit Pfeilen gekennzeichnet.

2. Western Blot Analyse der APJ-Expression im Hypophysen-zwischenlappen (HZL)

Anhand der Western Blot Analyse sollte die im Gehirnschnitt beobachtete APJ-Immunreaktivität (siehe Kap. 4.1) einem oder mehreren Proteinen in der Gelelektrophorese

zugeordnet werden und dessen/deren Molekularmasse(n) mit Daten aus der Literatur verglichen werden.

Durch die immunhistochemischen Markierungen in ZNS und Hypophyse konnte auf Proteinebene eine besonders hohe APJ-Expression im HZL der Ratte nachgewiesen werden (*Kap. 4.2 und Abbildung 30*). Anhand der Western Blots als zusätzliche Methode sollte daher in diesem Gewebe eine nähere Charakterisierung des APJ-R Antikörpers erfolgen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine des HZLs mittels SDS-PAGE erbrachte bei der Inkubation der die geblotteten Proteinbanden enthaltenden Nitrocellulosemembran mit einem β -Actin spezifischen Antikörper gemäß der RF-Methode (*siehe MM Kap. 6.2.3*) eine Molekülmasse von 43,5 kDa in Übereinstimmung mit der Fachliteratur. Die Markierung mit dem APJ-R Antikörper ergab vier deutlich ausgeprägte Banden bei niedriger unspezifischer Hintergrundmarkierung (*Abbildung 27 1-4*). Für die mit Pfeilen markierten Banden 1 und 2 wurde ebenfalls mit der RF-Methode eine Molekülmasse von 41,8 bzw. 49,5 kDa berechnet. Die Molekülmassen der beiden zusätzlichen Proteinbanden wurden mit 68,6 und 82,8 kDa ermittelt. Bei Verwendung des auch für die immunhistochemischen Doppelmarkierungen benutzten APJ-G Antikörpers konnten bei mit den gleichen Gewebeproben durchgeführten Western Blot Analysen keine Banden detektiert werden.

3. Apelin- und rAPJ-spezifische RT-PCR

Ziel dieses Versuchs war es, die Expression von rattenspezifischem APJ und Apelin auf mRNA-Ebene in Proben der MnPO- und PVN-angereicherten neuroglialen primären Zellkultur und den entsprechenden, zur Erstellung der Kultur verwendeten, Gewebeproben nachzuweisen. Dazu wurde in beiden Fällen eine qRT-PCR Analyse in der Gruppe von Linus Pauling bei Aventis in Frankfurt (a.M.) durchgeführt.

In den Proben der primären MnPO-angereicherten neuroglialen Kultur (*Abbildung 28*) ergaben sich bei der RT-PCR Differenzen bezüglich der ermittelten Werte. So wurde in der ersten Probe der höchste Wert für Apelin-spezifische mRNA aller Proben gemessen. In der zweiten Probe hingegen konnte dies nicht bestätigt werden. Bei beiden Proben konnte andererseits keine APJ-spezifische mRNA detektiert werden. Aus den Proben der neonatalen PVN-angereicherten Primärkultur ließen sich ebenfalls nur geringe Mengen an APJ- und Apelin-spezifischer mRNA nachweisen. Die Werte lagen für APJ deutlich, für Apelin

geringfügig unterhalb der Werte der entsprechenden Gewebeproben aus PVN neonataler Ratten (*Abbildung 28*). In den Gewebeproben des neonatalen PVN (=Pn) gelang hingegen der Nachweis in beiden Präparationen sowohl für APJ- als auch Apelin-spezifische mRNA. Dabei unterschieden sich die Werte für APJ wieder deutlich, bezüglich des Gehalts an Apelin-mRNA hingegen gab es erneut keine großen Unterschiede zwischen beiden Präparationen. In den MnPO-Gewebeproben neonataler Tiere (=Mn) wurden unterschiedliche Werte für die eingesetzten Proben bezüglich der APJ-Expression ermittelt: die erste Probe wies dabei den höchsten gemessenen Wert aller Proben auf, die zweite jedoch nur eine etwa halb so hohe Expression an APJ-spezifischer mRNA. In Bezug auf die Apelin-Expression unterschieden sich die beiden Präparationen jedoch kaum und zeigten ähnliche Werte wie die der Gewebeprobe aus der adulten Ratte (=Ma). Dieses, aus einem coronalen Gehirngewebeschnitt einer adulten Ratte präparierte MnPO-Gewebe wies auf mRNA-Ebene die zweithöchste APJ- und auch eine höhere Apelin-Expression als die Proben der Primärkultur auf (*Abbildung 28*).

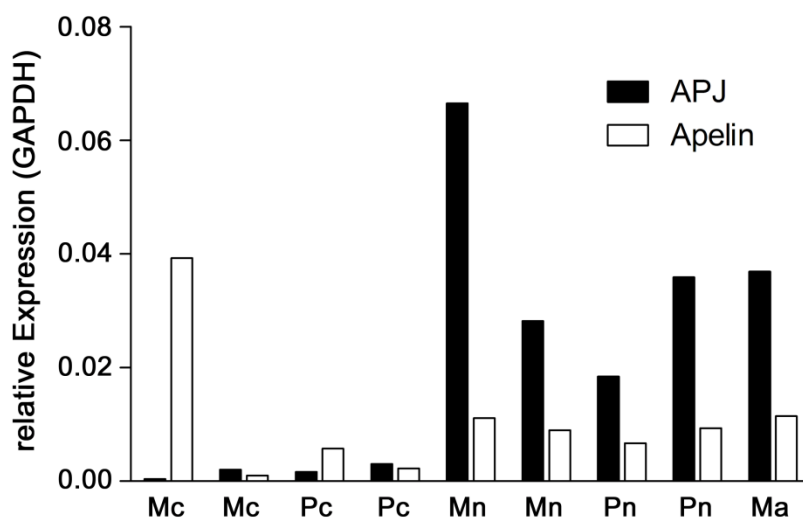


Abbildung 28: Relative Expressionsstärke APJ- und Apelin-spezifischer mRNA in Gewebe- und Primärzellkulturproben mittels qRT-PCR.

Zur Untersuchung wurden Wells der MnPO- (Mc) und PVN-angereicherten (Pc) neuroglialen Primärkultur verwendet. Weiterhin wurden Gewebeproben des PVN (Pn) und des MnPO (Mn) neonataler Tiere, welche wie zur Erstellung der primären, angereicherten neuroglialen Kulturen präpariert wurden, eingesetzt. Zusätzlich wurde das Gebiet des MnPO aus einem coronalen Gehirnschnitt eines adulten Tieres (Ma) extrahiert. Alle Proben wurden lysiert, die RNA extrahiert und zur qRT-PCR verwendet. Die Normalisierung erfolgte mit der Delta CT-Methode in Bezug auf das Referenzgen GAPDH (=Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase).

4. Immunhistochemische APJ-spezifische Markierungen im ZNS der Ratte

4.1 Semiquantitative Kartierung des APJ-Rezeptors in thalamischen, hypothalamischen und anderen Gehirnstrukturen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen bezogen sich bis *dato* hinsichtlich der Expression des APJ-Rezeptors auf einige wenige Kerngebiete des Hypothalamus (*siehe Einleitung*). Expressionsstudien in den Bereichen des vorderen *Telencephalon*, limbischer Strukturen, des Thalamus sowie vor allem weiterer hypothalamischer Nuclei liegen bisher nur eingeschränkt vor. Darüber hinaus beschränkten sich die vorhandenen Angaben vorrangig auf den Nachweis der APJ-spezifischen mRNA. Für die vorliegende, semiquantitative Kartierung der APJ-Expression in den immunhistochemisch, durch das APJ-R Antiserum (Verdünnung 1:1000), markierten coronalen Gehirnschnitten der Ratte wurde zwischen der APJ-Immunreaktivität (IR) in Faserstrukturen und Punctata sowie in Zellkörpern unterschieden. Stärke und vor allem Dichte der Immunfluoreszenzsignale wurden an Gewebeschnitten dreier perfundierter Tiere in 0, X, XX bis maximal XXX eingeteilt. Die in der Tabelle vorliegenden Auswertungen stellen den Mittelwert aus drei Tieren dar.

Im Bereich des *Septum* und des limbischen Systems wurde eine stark ausgeprägte Anzahl an APJ-IR Fasern vor allem im „Bed Nucleus“ der *Stria terminalis* (BNST) festgestellt (*Tabelle 10*). Die höchste Dichte befand sich dabei in den Substrukturen der medialen Division dieses Nucleus. In *Abbildung 29A* ist eine immunhistochemische APJ-spezifische Markierung in den mit der *Commissura anterior* assoziierten anterioreren (STMA) und ventralen (STMV) Komponenten des BNST zu erkennen. Im Gegensatz dazu fand sich in der lateralen Division des BNST nur in der ventralen/fusiformen Substruktur eine stärkere Ausprägung an APJ-immunreaktiven Fasern, jedoch konnten in der dorsalen Substruktur zahlreiche APJ-positive Perikaryen detektiert werden (*Abbildung 33G+H*). Verglichen mit dem BNST zeigten der *Nucleus amygdaloides medialis posterodorsalis* eine etwas schwächer ausgeprägte, hingegen die *Nuclei septales mediales* und *laterales* eine deutlich niedrigere Dichte an APJ-immunreaktiven Faserstrukturen.

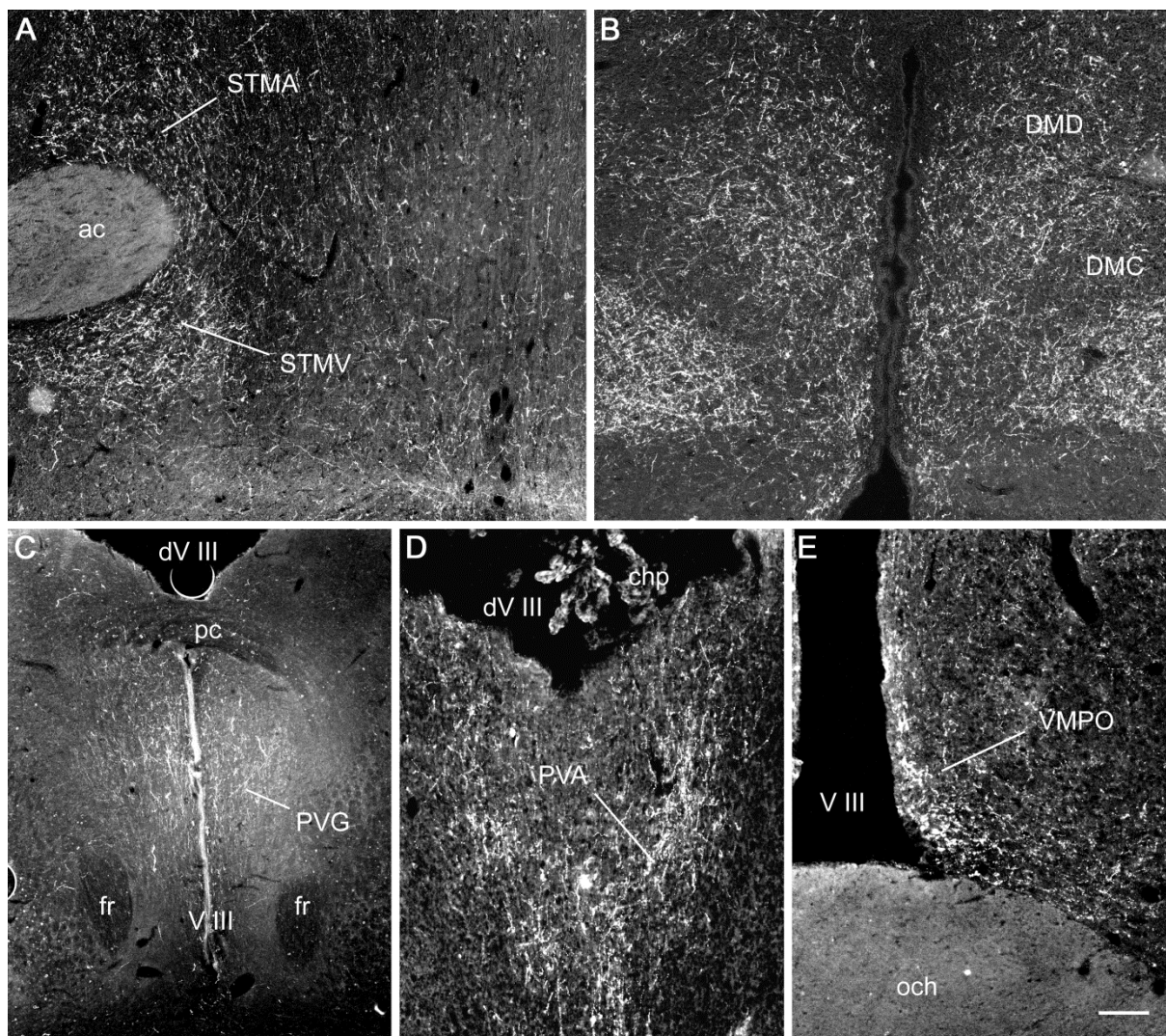


Abbildung 29: APJ-Immunreaktivität (IR) in hypothalamischen und thalamischen Strukturen des Gehirns der Ratte.

Nachweis der APJ-Expression durch Markierung mit polyclonalem rabbit anti-rAPJ Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem (weiß) donkey anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. (A) Markante APJ-spezifische Immunreaktivität (IR) in Faserstrukturen ventral und dorsal der Commissura anterior (ac) im anterioren (STMA) und ventralen Teil (STMV) der medialen Devision des „Bed Nucleus“ der Stria terminalis. (B) Ausgeprägte APJ-IR in der kompakten (DMC) und dorsalen Komponente des Nucleus dorsomedialis hypothalami (DMD). (C) Immunfluoreszenz im Bereich des periventrikulären „Graus“ (PVG); mit Commissura posterior (pc), Fasciculus retroflexus (fr) und dorsalem Teil des 3.Ventrikels (dV III). (D) APJ-immunpositive Faserstrukturen im Nucleus paraventricularis thalami (PVA) mit Plexus choroideus (chp) im dV III. (E) APJ-IR mit dem am Chiasma opticum (och) gelegenen Nucleus praeopticus ventromedialis (VMPO). V III: 3.Ventrikel; Größenmarker: A+B: 100µm, C: 200µm, D+E: 50µm

Für den Thalamus konnte eine hohe Dichte an APJ-immunpositiven Fasern vor allem im Nucleus praecommissuralis (PrC), im Nucleus paraventricularis thalami (PVA) sowie im

periventrikulären „Grau“ (PVG) nachgewiesen werden (*Abbildung 29C+D*). Schwächer ausgeprägte Immunfluoreszenzsignale wurden im *Nucleus reuniens*, im *Nucleus posterior thalami* und im *Nucleus rhomboideus* detektiert. Alle weiteren im Thalamus untersuchten Strukturen zeigten keine oder eine nur sehr schwache Proteinexpression des APJ-Rezeptors.

Verglichen mit den anderen in dieser Studie untersuchten Bereichen des Gehirns (*Tel-, Di-, Mesencephalon*) fand sich im Hypothalamus die am stärksten ausgeprägte APJ-IR. Dies bezog sich sowohl auf die Dichte der neuronalen Faserstrukturen und Punctata als auch der Zellkörper (Perikaryen). Dabei konnten lediglich in vier Kerngebieten eindeutig neuronale Zellkörper als APJ-immunpositiv klassifiziert werden. Der *Nucleus supraopticus* (SON), inklusive seiner retrochiasmatischen Komponente (SOR), zeigte nur wenige Zellen mit APJ-IR (*Tabelle 10 und Abbildung 32E+F*). Im Gegensatz dazu wurde sowohl im *Nucleus paraventricularis hypothalami* (PVN) als auch im *Nucleus arcuatus* (ARC) eine wesentlich höhere Dichte an APJ-positiven Zellkörpern detektiert. Im PVN war diese Dichte im magnozellulären Bereich (PaLM) gefolgt vom parvozellulären Teil (PaV) des Nucleus am stärksten ausgeprägt (*Abbildung 32A-C*). Im Gegensatz dazu konnte im PaV eine deutlich höhere Dichte an APJ-immunpositiven Fasern als im PaLM registriert werden. Ersichtlich ist das auch in *Abbildung 32A*, welche eine immunhistochemische Fluoreszenzmarkierung des kompletten PVN zeigt. Im *Nucleus arcuatus* (ARC) zeigten der laterale und der mediale Bereich eine stark ausgeprägte IR sowohl APJ-positiver Zellen als auch Fasern. Im *Pars dorsalis* des ARC hingegen konnten keine entsprechenden Zellkörper nachgewiesen werden. Auch die Dichte an APJ-immunreaktiven Fasern erwies sich als niedriger, verglichen mit den beiden anderen Subnuclei (*Abbildung 33A-E*).

Weitere hypothalamische Kerngebiete mit hoher Dichte an APJ-positiven Faserstrukturen waren der *Nucleus dorsomedialis*, die *Area retrochiasmatica*, der *Nucleus praeopticus ventromedialis* (VMPO) (*Abbildung 29E*), die *Area praeopticus medialis* und der *Nucleus periventricularis anteroventralis*. Beim dorso-medialen Nucleus zeigte der dorsale Teil (DMD) gegenüber dem zentralen Bereich (DMC) dieses Gebietes eine höhere Intensität (*Abbildung 29B*).

Auch der *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) gehörte zu den Regionen mit stark ausgeprägter Dichte an APJ-immunreaktiven Fasern, jedoch konnten keine entsprechenden APJ-immunpositiven Perikaryen detektiert werden. Im anterioren Teil des MnPO war die

Dichte der Fasern etwas geringer als im dorsalen Bereich. Im ventralen Gebiet dieser Struktur war die Dichte der Fasern am höchsten (*Abbildung 32G-I*). Im Bereich des *Nucleus suprachiasmaticus* konnte kaum APJ-IR aufgezeichnet werden.

Bei den circumventrikulären Organen (CVOs) ohne ausgeprägte Blut-Hirnschranke (BHS) hatte das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) eine hohe Dichte an Faserstrukturen. Weiterhin zeigte die *Zona interna* der *Eminentia mediana* (ME) ebenfalls eine Markierung für APJ-immunpositive Fasern. Im Gegensatz dazu war in der *Zona externa* kaum APJ-IR vorhanden. Alle anderen untersuchten CVOs wie das Subfornicalorgan (SFO), die *Area postrema*, oder das Subcommisuralorgan mit intakter BHS zeigten kaum bis sehr wenig APJ-immunpositive Fasern. Auch der *Plexus choroideus* enthielt keine bis sehr wenig APJ-IR. Beispiele immunhistochemischer APJ-Markierungen in der ME, dem OVLT und dem SFO sind in *Abbildung 32 M, L und N* zu sehen.

Tabelle 10: Semiquantitative Kartierung APJ-immunhistochemischer Markierungen in vorwiegend hypothalamischen und thalamischen Kerngebieten des Rattengehirns. Einteilung nach Anzahl und Dichte der Immunreaktivität in Faserstrukturen und Zellkörpern (0, X, XX, XXX) ($n=3$) mit Verweis auf exemplarische Darstellungen der Immunfluoreszenzen für die betreffende Struktur (Abb.). Die Abkürzungen für die Regionen und Nuclei sind aus Paxinos und Watson (2005) übernommen.

		APJ Fasern	APJ Zellen	Abb.
Komponenten des limbischen Systems				
Nucleus septalis medialis	(MS)	0-x	0	
Nucleus septalis lateralis			0	
-pars intermedialis	(LSI)	x-xx	0	
-pars dorsalis	(LSD)	0-x	0	
-pars ventralis	(LSV)	x-xx	0	
Nucleus stria terminalis (Bed nucleus)				
+divisio medialis				
-pars anterior	(STMA)	xx-xxx	0	Abb. 29/Abb. 33F
-pars ventralis	(STMV)	xx-xxx	0	Abb. 29A/Abb. 33F
-pars anteriomedialis	(STMAM)	xx-xxx	0	
-pars posteromedialis	(STPM)	xx-xxx	0	
+divisio lateralis				
-pars posterior	(STLP)	x	0	
-pars ventralis/fusiformes	(STLV/Fu)	xx-xxx	0	
-pars dorsalis	(STLD)	x-xx	xx-xxx	Abb. 33G+H
-pars juxtacapsularis	(STLJ)	x	0	

+divisio intraamygdaloidalis	(STIA)	x	0	
Stria medullaris thalami	(sm)	0-x	0	
Stria terminalis	(st)	0-x	0	
Nucleus amygdaloides medialis				
-pars posterodorsalis	(MePD)	xx-xxx	0	
Nucleus amygdaloides basomedialis				
-pars posterior	(BMP)	xx	0	
Area amygdalohypocampalis				
-pars anterolateralis	(AHiAL)	xx	0	

Thalamus				
Nucleus habenularis lateralis	(LHb)	0-x	0	
-pars medialis	(LHbM)	x	0	
Nucleus habenularis medialis	(MHb)	0-x	0	
Nuclei anterodorsalis	(AD)	0	0	
Nuclei anteromedialis	(AM)	0-x	0	
Nuclei mediodorsalis	(MD)	0-x	0	
Nucleus paraventricularis	(PVA)	xxx	0	Abb. 29D
-pars posterior	(PVP)	xxx	0	
Nucleus reuniens	(Re)	x-xx	0	
Nucleus centromedialis	(CM)	x	0	
Nuclei genicularis lateralis ventralis	(VLG)	0	0	
Nuclei genicularis medialis	(MG)	0	0	
Nucleus subgenicularis	(SubG)	0	0	
Zona incerta	(ZI)	x	0	
Nucleus commissuralis posterior	(Pcom)	0	0	
Nucleus precommissuralis	(PrC)	xx-xxx	0	
Nucleus paratenialis thalami	(PT)	x	0	
Nucleus posterior thalami	(PH)	x-xx	0	
Substantia grisea centralis	(PVG)	xx-xxx	0	Abb. 29C
Commissura posterior	(pc)	0-x	0	
Nucleus rhomboideus thalami	(Rh)	xx	0	
Nucleus reuniens vantralis thalami	(VRe)	x-xx	0	

Hypothalamus				
Nucleus suprachiasmaticus	(SCN)	0-x	0	
Area posterior hypothalami				
-pars dorsalis	(PHD)	xx	0	
Area anterior hypothalami	(AHA)	x-xx	0	
-pars centralis/posterior	(AHC/AHP)	x	0	
Area lateralis hypothalami	(LHA)	xx	0	
-area tuberalis	(TuLH)	x-xx	0	
Nucleus supraopticus	(SON)	x	xx	
-retrochiasm.	(SOR)	x	0-x	
Nucleus paraventricularis	(PVN)			Abb. 32A-D
-pars parvocellularis	(PaMP)	xxx	x-xx	
-pars magnocellularis	(PaLM)	x	xx-xxx	
-pars periventricularis	(PaV)	xxx	x	

Nucleus periventricularis	(Pe)	xxx	0	
Nucleus arcuatus	(ARC)			<i>Abb. 33A-E</i>
-pars lateralis	(ARC-L)	xxx	xx-xxx	
-pars medialis	(ARC-M)	xxx	xx-xxx	
-pars dorsalis	(ARC-D)	xx	0	
Nucleus ventromedialis	(VMH)	x	0	
Nucleus dorsomedialis	(DM)			
-pars centralis	(DMC)	xx	0	<i>Abb. 29B</i>
-pars dorsalis	(DMD)	xxx	0	<i>Abb. 29B</i>
Nuclei premammillaris vent.	(PMV)	x-xx	0	
Nuclei mammillaris medialis	(MnM)	x-xx	0	
Nuclei mammillaris lateralis	(LM)	0-x	0	
Nucleus supramammillaris	(SuM)	0	0	
Area retrochiasmaticus	(RCh)	xxx	0	
Nucleus tuberomammillaris ventralis	(VTM)	xx	0	
-pars dorsalis	(DTM)	xx	0	
Nucleus accumbens „shell“	(AcbSh)	xx	0	
Nucleus septohypothalamis	(sHy)	x	0	
Nucleus praeopticus ventromedialis	(VMPO)	xxx	0	<i>Abb. 29E</i>
Nucleus praeopticus medianus	(MnPO)			<i>Abb. 32G-I</i>
-pars anterior		x-xx	0	
-pars dorsalis		xx	0	
-pars ventralis		xxx	0	
Area praeopticus medialis	(MPO)	xx-xxx	0	
Nucleus praeopticus medialis	(MPOM)	x-xx	0	
Area praeopticus lateralis	(LPA)	x-xx	0	
Nucleus periventricularis anterovent.	(AVPe)	xx-xxx	0	

Circumventrikuläre Organe und Plexus choroideus				
Organum vasculosum laminae terminalis	(OVLT)	xx-xxx	0	<i>Abb. 32L</i>
Organum subfornicale	(SFO)	0-x	0	<i>Abb. 32N</i>
Eminentia mediana	(ME)			<i>Abb. 32M</i>
-zona interna	(MEI)	xx	0	<i>Abb. 32M</i>
-zona externa	(MEE)	0-x	0	<i>Abb. 32M</i>
Organum subcommissurale	(SCO)	0-x	0	
Area postrema	(AP)	0	0	
Plexus choroideus	(chp)	0	0-x	

4.2 Immunhistochemischer Nachweis der APJ-Expression in der Hypophyse

Im Rahmen der (extra)-hypothalamischen Kartierungsstudie zur APJ-Expression ließ sich immunhistochemisch auch in der Hypophyse der Ratte APJ-spezifische Immunreaktivität

nachweisen (*Abbildung 30*) Im Hinterlappen der Hypophyse (HHL) konnte keine APJ-Immunreaktivität detektiert werden (*Abbildung 30A*). Im Gegensatz dazu zeigten nahezu alle Zellen im Bereich des Zwischenlappens (HZL) eine ausgeprägte APJ-immunpositive Markierung. (*Abbildung 30A+B*). Im Vorderlappen der Hypophyse (HVL) ließen sich zahlreiche, relativ regelmäßig verteilte APJ-immunpositive Zellen nachweisen, wobei diese sowohl vereinzelt als auch in Gruppen positioniert waren (*Abbildung 30A+C*).

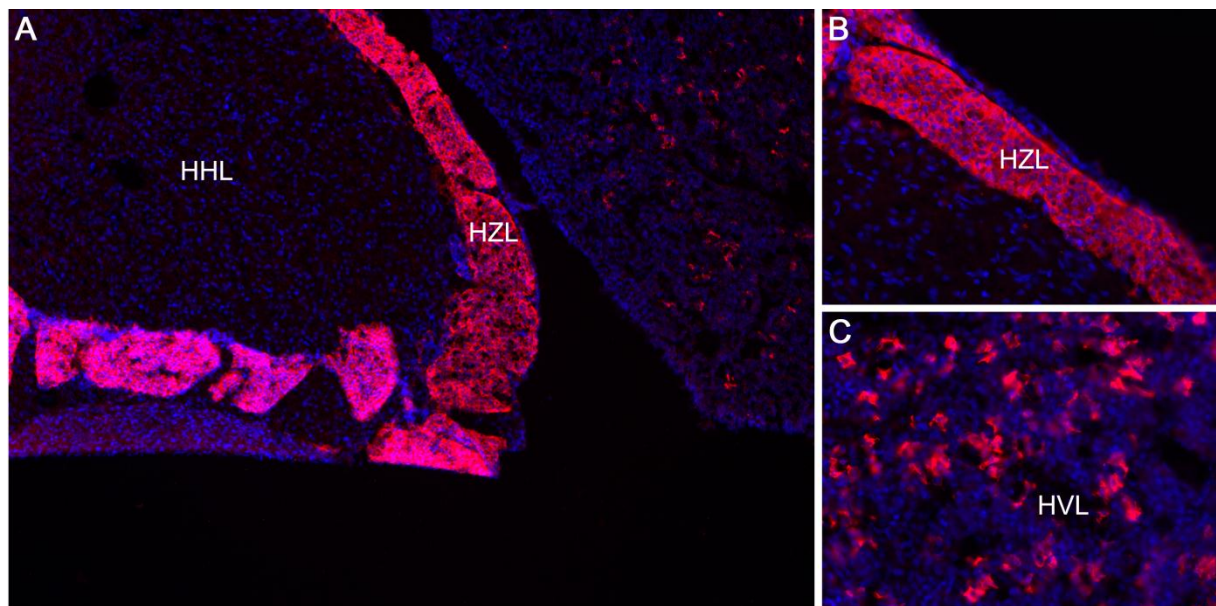


Abbildung 30: Immunhistochemische Fluoreszenzmarkierung für APJ in der Hypophyse der Ratte.

Nachweis der APJ-Expression durch Markierung mit polyclonalem rabbit anti-rAPJ als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem (rot) donkey anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI (blau). (A) Übersichtsaufnahme ohne APJ-spezifische Immunreaktivität (IR) in den Zellen der Pars nervosa (Hinterlappen, HHL), bei ausgeprägter Immunmarkierung nahezu aller Zellen der Pars intermedia (Zwischenlappen, HZL). Disseminiertes Muster APJ exprimierender Drüsenzellen im Bereich der Pars distalis (Vorderlappen, HVL). (B+C) Höhere Vergrößerung eines Ausschnitts des HZL (B) und des HVL (C). Größenmarker: A 200 µm; B 25 µm; C 50 µm

5. Immuncytochemische, APJ-spezifische Markierungen in der neuroglialen Nucleus arcuatus (ARC)-Primärkultur

Basierend auf den in *Kap. II.3* dargestellten RT-PCR Untersuchungen konnte die Expression des APJ-Rezeptors auf mRNA Ebene in den MnPO- sowie PVN-angereicherten

Primärkulturen und den zur Erstellung dieser Kulturen präparierten Nuclei nachgewiesen werden.

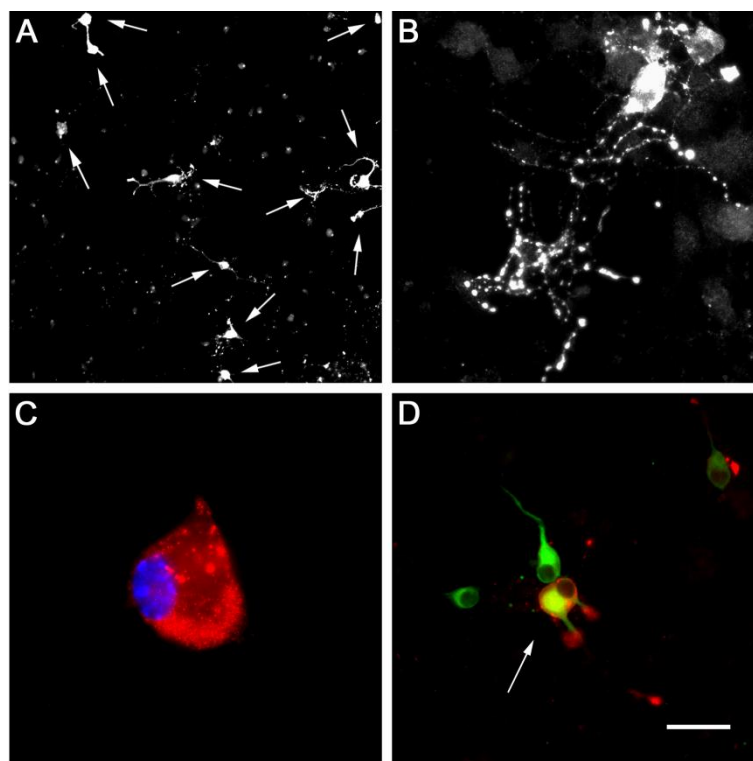


Abbildung 31: Cytoimmunfluoreszenzmarkierung für den APJ-Rezeptor in der Nucleus arcuatus (ARC)-angereicherten, neuroglialen Primärkultur.

Nachweis der APJ-Expression und des neuronalen Markers MAP2a+b durch Markierung mit polyclonalem rabbit anti-rAPJ und monoklonalem mouse anti-MAP2a+b als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem (rot) donkey anti-rabbit IgG bzw. Alexa488-gekoppeltem (grün) donkey anti-mouse IgG als Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI (blau). (A) Übersichtsaufnahme der ARC Primärkultur mit zahlreichen APJ-immunpositiven Zellen (Pfeile). (B) Darstellung einer APJ-immunpositiven ARC-Zelle mit perlenschnurartigen Zellausläufern. (C) Partiiell subzelluläre Darstellung der APJ-IR mit Zellkernfärbung DAPI. (D) Zelluläre Co-Expression von APJ und MAP2a+b in einem Zellcluster der ARC Primärkultur mit doppelt markiertem Neuron (Pfeil). Größenmarker: A: 100 µm, B+D: 25 µm, C: 10 µm

Auch auf Proteinebene gelang durch die immunhistochemische Kartierung des APJ-Rezeptors (Kap. II.4.1) die Darstellung der APJ Expression in zahlreichen hypothalamischen Kerngebieten. Vor allem im PVN, SON sowie im Bereich des mediolateralen ARC konnten zahlreiche Neurone mit markanter APJ-IR demonstriert werden (Abbildung 32+33). Anhand einer Primärzellkultur des ARC neonataler Ratten (siehe Kap. MM III.1.1) sollte daher die APJ-Expression durch Cytoimmunfluoreszenzmarkierungen auf Einzelebene bestätigt werden.

In der neuroglialen Primärkultur des *Nucleus arcuatus* 5-6 Tage alter Ratten konnten anhand der immunocytochemischen Untersuchungen zum Nachweis des APJ-Rezeptors mithilfe des APJ-R Antikörpers (Verdünnung 1:1000) an fünf Wells aus vier Zellpräparationen zahlreiche Zellen mit ausgeprägten Zellausläufern identifiziert werden (*Abbildung 31*). Die immunocytochemische Doppelmarkierung für den neuronalen Marker MAP2a+b ermöglichte die klare Charakterisierung der Mehrzahl aller APJ-immunpositiven Zellen als Neurone (*Abbildung 31*).

III. Co-Expression des APJ-Rezeptors mit nNOS und Neuropeptiden

1. Co-Expression des APJ-Rezeptors mit nNOS in hypothalamischen Kerngebieten

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, spielt zentrales NO im Hypothalamus für viele homöostatische Regelsysteme zur Konstanthaltung kardiovaskulärer Parameter, des Energiehaushalts, der HPA-Achse, des Salz-/Wasserhaushalt und der Körpertemperatur eine wichtige Rolle (Gerstberger, 1999; Kadekaro und Summy-Long, 2000; Nelson, 2005; Currie et al., 2011). Um einen möglichen Zusammenhang auf neuronaler Ebene zu untersuchen, sollte deshalb in dieser Studie die Co-Expression des APJ-Rezeptors vor allem im Bereich des Hypothalamus der Ratte mit der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) untersucht werden. Dabei galt das Hauptinteresse den Kerngebieten mit hoher Dichte an APJ-immunreaktiven Perikaryen, Nervenfasern bzw. Punctata (*siehe Kap. 4.1*), bekanntermaßen ausgeprägter Expression der nNOS und Bedeutung für die Homöostase der Körpertemperatur, des Salz- und Wasserhaushaltes bzw. der Kreislauf- und Energieregulation. Dazugehören u.a. die Kerngebiete des PVN, SON, MnPO und ARC, sowie die circumventrikulären Organstrukturen des OVLT, SFO und der ME. Unter den Teilkomponenten des limbischen Systems weist vor allem der BNST eine limitierte Funktion für die Regulation des kardiopulmonalen Systems auf (Zhang et al., 2009).

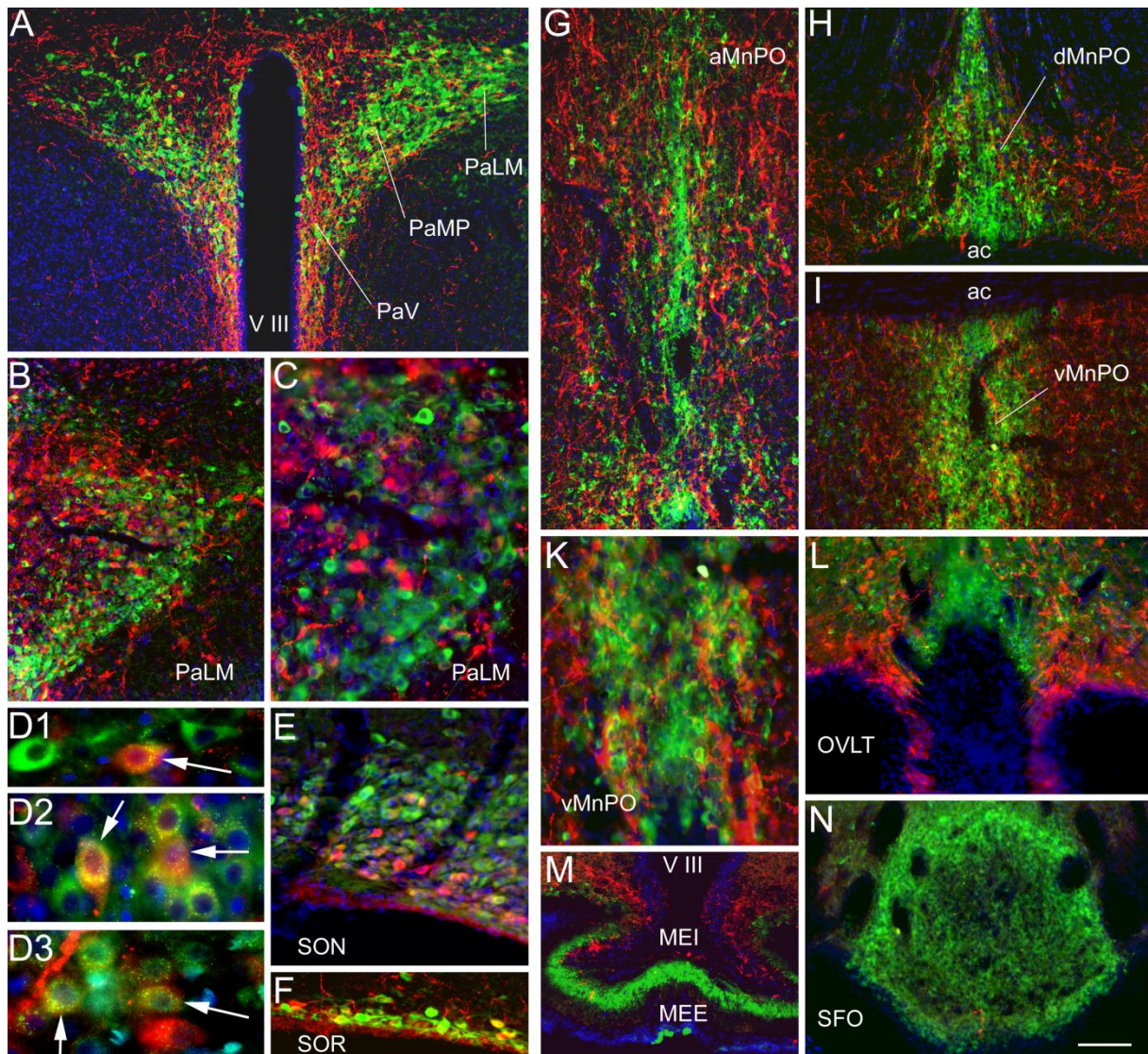


Abbildung 32: Immunhistochemische Co-Distribution und -Expression des APJ-Rezeptors und neuronaler Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) in hypothalamischen Kerngebieten der Ratte.

Nachweis der Expression von APJ und nNOS durch Markierung mit polyclonalem rabbit anti-rAPJ und polyclonalem mouse anti-nNOS als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem (rot) donkey anti-rabbit IgG bzw. Alexa488-gekoppeltem (grün) donkey anti-mouse IgG Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI (blau). (A-C) Co-Lokalisation und -Distribution von nNOS- und APJ-immunpositiven Zellkörpern, Faser- und Punctatastrukturen in den Substrukturen des Nucleus paraventricularis; PaLM=magnozellulär; PaMP=parvozellulär; PaV=periventrikulär (D1-3) Co-Lokalisation nNOS- und APJ-immunpositiver magnozellulärer Neurone des PaLM (Pfeile). (E) Co-Lokalisation und -Distribution APJ- und nNOS-immunreaktiver Perikaryen im Nucleus supraopticus (SON) und (F) im rostralen Teil des SON (SOR). Co-Distribution nNOS immunpositiver Zellen und APJ-immunreaktiver Fasern in Strukturen des (G) anterioren, (H) dorsalen und (I+K) ventralen Nucleus praeopticus medianus (MnPO) und (L) des Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT). Differentielle Expression des APJ-Rezeptors und der nNOS in (M) der Eminentia mediana; MEI= Zona interna; MEE= Zona externa; V III= 3.Ventrikel; (N) Exklusive Expression der nNOS im Organum subfornicale (SFO). Größenmarker: A 200µm; B, G-I und L-N 100 µm; C,E,F,K 50 µm; D1-3 20 µm

Neben dem Erfassen einer Co-Distribution APJ-immunpositiver Fasern mit nNOS-immunreaktiven Perikaryen und/oder Fasern war die quantitative Analyse einer direkten Co-Expression von APJ und nNOS in einzelnen Neuronen von Bedeutung. Daher wurden APJ- und nNOS-immunreaktive Zellen sowie Neurone mit eindeutiger APJ/nNOS Co-Expression in den Kerngebieten PVN, SON, dem rostralen Teil des SON (SOR) und im ARC quantitativ ausgewertet. Die Struktur des PVN wurde im Rahmen der Auswertung in seine periventrikulären (PaV), parvozellulären (PaMP) und magnozellanulären (PaLM) Subnuclei unterteilt. Exemplarische Aufnahmen der immunhistochemischen Doppelmarkierungen für die genannten hypothalamischen Kerngebiete und CVOs sind in *Abbildung 32* zu sehen.

Obwohl im *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) keine APJ-immunpositive Perikaryen nachgewiesen werden konnten, wurde jedoch eine hohe Dichte an entsprechenden, APJ-immunpositiven Faserstrukturen detektiert, welche sich in unmittelbarer Nähe zu den dortigen zahlreichen, nNOS-immunreaktiven Perikaryen befanden. Diese Co-Distribution war sowohl im anterioren (*Abbildung 32G*) als auch im dorsalen (dMnPO, *Abbildung 32H*) und ventralen (vMnPO, *Abbildung 32I*) Teil dieser Struktur vorhanden. In einer vergrößerten Aufnahme des vMnPO ist die räumliche Nähe und Überlagerung der nNOS-immunreaktiven (ir) Perikaryen mit den APJ-immunpositiven Fasern deutlich ersichtlich (*Abbildung 32K*). Wie der MnPO zeigte das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) ebenfalls eine ausgeprägte Co-Distribution von APJ-ir Fasern und nNOS-ir Perikaryen (*Abbildung 32L*). Im Gegensatz dazu war in den unterschiedlichen Zonen der *Eminentia mediana* eine differenzielle Expression von APJ und nNOS zu beobachten. So konnten nur wenige APJ-ir Fasern im Bereich des nNOS-immunpositiven Strukturkomponente detektiert werden (*Abbildung 32M*). Auch im *Organum subformicale* (SFO) zeigten sich bei stark ausgeprägter nNOS-ir nur sehr wenige APJ-ir Fasern (*Abbildung 32N*). Im Gegensatz dazu enthielten die einzelnen Substrukturen des „Bed Nucleus“ der *Stria terminalis* neben den zuvor schon beschriebenen, teilweise markant ausgeprägten APJ-IR in Form von Faser- und Zellstrukturen nur sehr wenige entsprechend Co-distribuierte nNOS-positive Zellen (*Abbildung 33F-H*).

Die Auswertung der quantitativen Co-Lokalisationsanalyse für die Zellen von PVN, SON, SOR und ARC an für APJ und nNOS immunhistochemisch markierten Gewebeschnitten ist in *Abbildung 34* dargestellt. Hierfür wurden die Mittelwerte der Analysen von drei bis vier Schnitten pro Tier bei einer n-Zahl von vier Ratten verwendet.

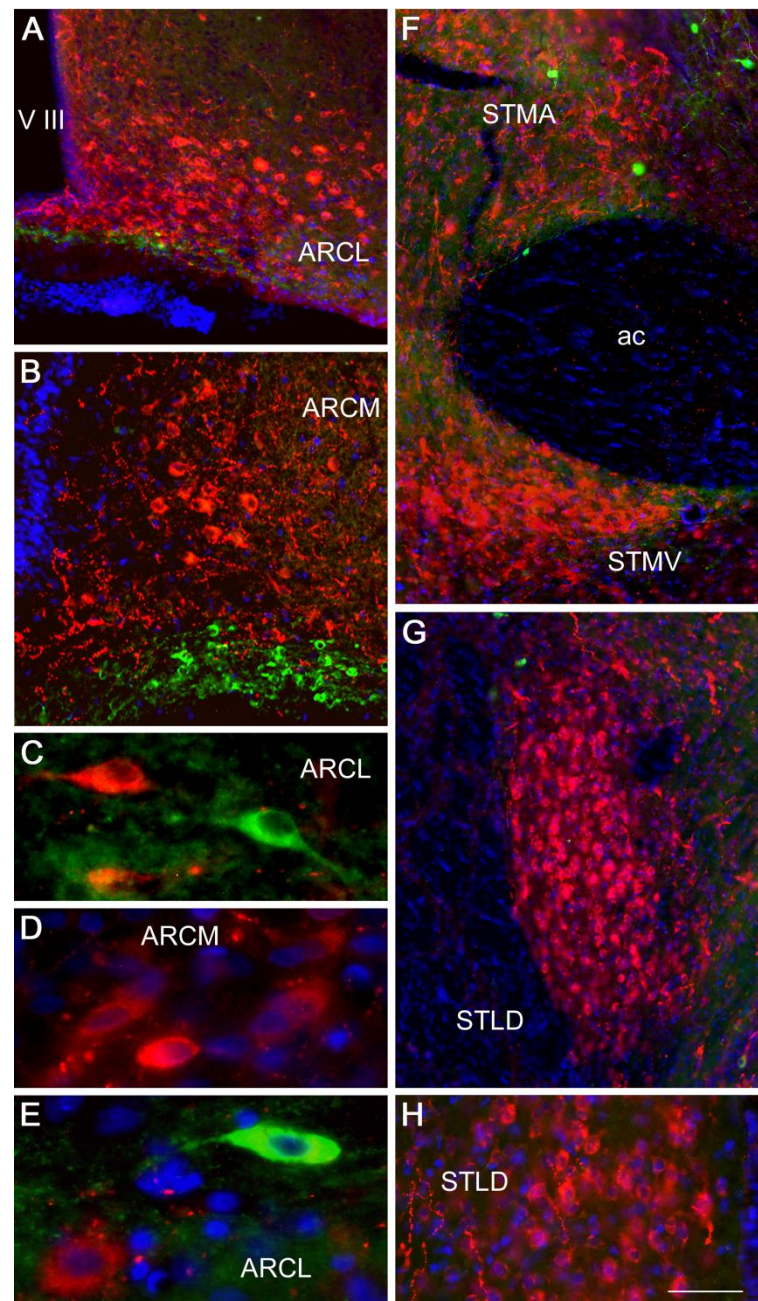


Abbildung 33: Immunhistochemische Co-Distribution und -Expression des APJ-Rezeptors mit neuronaler Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) im Nucleus arcuatus (ARC) und im „Bed Nucleus“ der Stria terminalis (BNST) der Ratte.

Nachweis der Expression von APJ und nNOS durch Markierung mit polyclonalem rabbit anti-rAPJ und polyclonalem mouse anti-nNOS Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem (rot) donkey anti-rabbit IgG bzw. Alexa488-gekoppeltem (grün) donkey anti-mouse IgG Sekundärantikörper. Markierung aller Zellkerne mit DAPI (blau). (A+B) APJ-immunpositive Perikaryen im lateralen (ARCL) und medialen Bereich (ARCM) des Nucleus arcuatus und (B) Bereich mit nNOS-immunreaktiven Fasern der Eminentia mediana unterhalb des ARCM. APJ-immunpositive Perikaryen im (D) ARCM und Co-Distribution APJ- und nNOS-immunpositiver Perikaryen im (C+E) ARCL. V III= 3.Ventrikel; (F) Hohe Dichte APJ-immunreaktiver Faserstrukturen im ventralen Teil des medialen Bereichs (STMV) des BNST und schwächere Ausprägung im anterioren Teil (STMA) des BNST. ac= Commissura anterior; (G+H) APJ-immunpositive Perikaryen im dorsalen Teil des lateralen Bereichs (STLD) des BNST. Größenmarker: A,F,G 100 µm; B,H 50 µm; C-E 20 µm

Abbildung 34A zeigt die Darstellung der absolut ermittelten Zahlen an APJ- bzw. nNOS-immunpositiven Neuronen. Diese erwiesen sich sowohl für den gesamten PVN und auch in dessen ventralen (PaV) und parvozellulären (PaMP) Substrukturen als jeweils vergleichbar hoch mit beispielsweise $43,5 \pm 1,0$ nitrergen und $39,1 \pm 8,7$ APJ exprimierenden Nervenzellen für den PaMP. Nur im magnozellulären Bereich der Struktur (PaLM) wurden im Mittel mehr APJ-immunpositive ($80,9 \pm 13,4$) als entsprechend nNOS-positive Neurone ($60,1 \pm 7,6$) gezählt. Im Gegensatz dazu erwies sich für den SON die Anzahl magnozellulärer Neurone mit Expression der nNOS ($71,6 \pm 5,2$) bzw. des APJ ($75,2 \pm 4,4$) wiederum sehr ähnlich ausgeprägt (*Abbildung 32E*). Unterschiede in der Zahl der APJ- und nNOS-immunpositiven Zellen ergaben sich im SOR. Hier zeigten nur sehr wenige Zellen einen APJ-immunpositiven Phänotyp ($4,3 \pm 3,0$) gegenüber einer deutlich höheren Anzahl nitrerger Neuronen ($23,9 \pm 4,5$) (*Abbildung 32F*). Ein dazu Gegenteiliges Ergebnis ergab die Auszählung im ARC. In diesem Gebiet konnten nur sehr wenige nNOS-ir Neurone ($5,8 \pm 2,1$) im Vergleich zu den hier zahlreichen APJ-ir Zellen ($51,5 \pm 13,8$) nachgewiesen werden.

Abbildung 34B zeigt das Zahlenverhältnis von co-exprimierenden Zellen der einzelnen Nuclei zu den Zellen der APJ- bzw. nNOS-immunpositiven Zellen. Diese Zahlenverhältnisse beschreiben somit den prozentualen Anteil an Zellen der APJ exprimierenden Zellpopulation an, welcher auch nNOS exprimiert, sowie den entsprechenden Anteil APJ-immunpositiver Zellen an der nitrergen Zellpopulation. Betrachtet für den gesamten PVN zeigten $34,4 \pm 3,3$ % aller APJ-Zellen auch eine Co-Lokalisation mit nNOS und entsprechend $38,2 \pm 3,2$ % aller nitrergen Zellen eine Expression des APJ Rezeptors. Für die Substrukturen PaV und PaMP lagen die jeweiligen Werte dieser Anteile mit 20-25 % unterhalb des Schnittes für den gesamten PVN. Im PaLM hingegen wurden deutlich höhere Verhältniswerte, verglichen mit den beiden anderen Substrukturen des PVN, ermittelt. Der Anteil nitrerger Neurone, die zusätzlich den APJ Rezeptor exprimierten ($56,7 \pm 2,8$ %) erwies sich im magnozellulären PVN somit als höher als derjenige APJ exprimierender Neurone, die ebenfalls nNOS synthetisieren ($42,1 \pm 3,5$ %). Eine entsprechende Co-Lokalisation von APJ- und nNOS-Immunreaktivität im PaLM ist in den Aufnahmen der immunhistochemischen Doppelmarkierung in *Abbildung 32C+D* ersichtlich. Neben der Analyse direkter Co-Lokalisation konnte in allen Substrukturen des PVN, speziell aber für den PaLM, auch eine markant ausgeprägte Co-Distribution von APJ-immunreaktiven Fasern und nNOS-immunpositiven Neuronen festgestellt werden (*Abbildung 32A+B*).

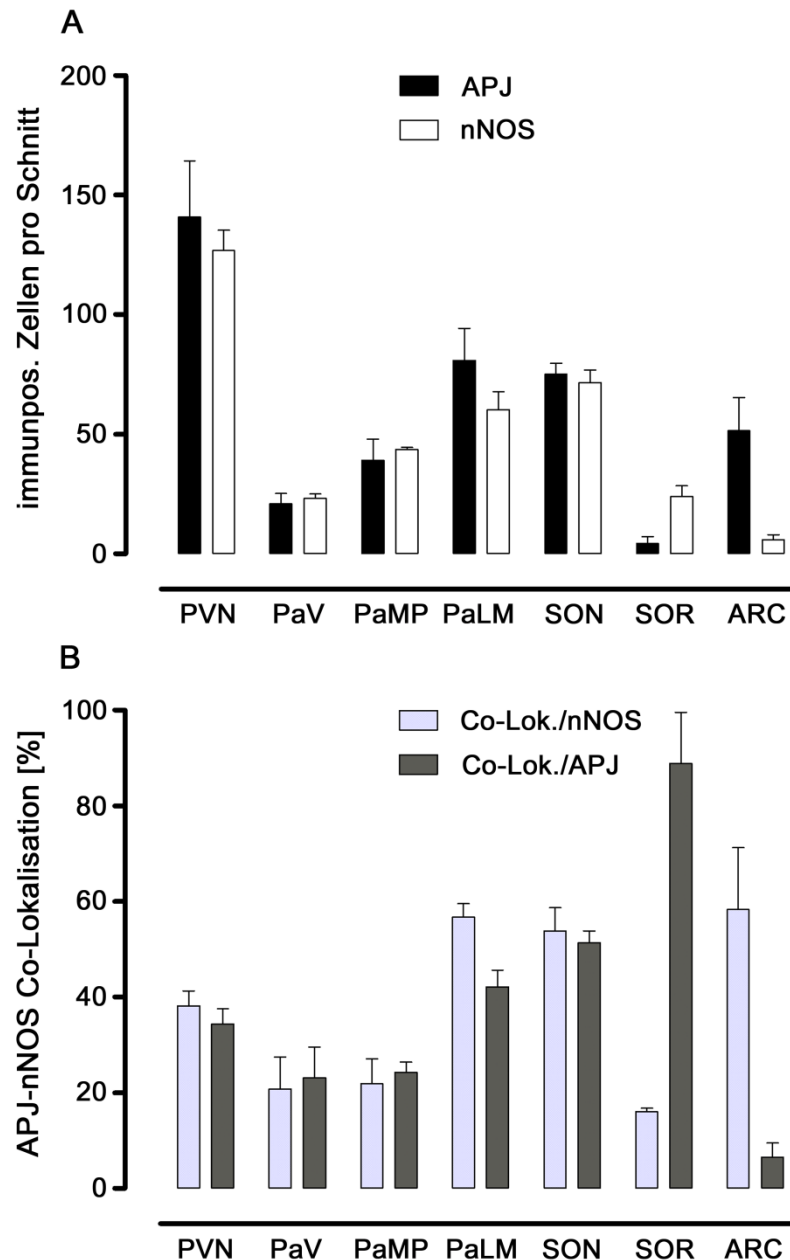


Abbildung 34: Evaluierung der immunhistochemischen Doppelmarkierungen für APJ und nNOS.

Die Darstellung zeigt Mittelwerte der Auszählungsergebnisse aus 3-5 seriellen Schnitten je Tier ($n=4$) und Struktur \pm S.E.M. (A) Anzahl APJ- und nNOS-immunpositiver Zellen in hypothalamischen Kerngebieten und Substrukturen (B) Verhältnis von Co-Lokalisierten zu APJ-immunreaktiven und von Co-Lokalisierten zu nNOS-immunpositiven Zellen. ARC= Nucleus arcuatus; PVN= Nucleus paraventricularis hypothalami; PaV=ventraler, PaLM=parvozellulärer und PaMP= magnozellularer Teil des PVN, SON= Nucleus supraopticus, SOR = rostraler Bereich des SON.

Aufgrund nur vereinzelter APJ-immunreaktiver Fasern im SON und SOR wurde in diesen Strukturen nur eine Co-Lokalisation oder -Distribution der entsprechend immunpositiven Perikaryen untersucht. Bei der Analyse der Co-Lokalisation in Zellen des SON konnten für beide Verhältnisse ebenfalls relativ gleiche Anteile von jeweils ca. 50 % bestimmt werden. Für den SOR als lateraler Komponente des SON ergab sich, dass von den zahlreichen nitrergen Neuronen (*Abbildung 34A*) lediglich $16,1 \pm 0,7$ % den APJ Rezeptor exprimierten (*Abbildung 34B*), wohingegen 88,9 % der wenigen APJ-immunpositiven Nervenzellen sich als nitrerg erwiesen (*Abbildung 34B*). In *Abbildung 32E+F* ist ein Teil des SON bzw. des SOR mit entsprechend doppelmarkierten Neuronen abgebildet.

Bei der Kartierungsstudie konnte im ARC eine markant ausgeprägte APJ-Immunreaktivität sowohl in Perikaryen als auch Faserstrukturen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu enthielt der Großteil des *Nucleus arcuatus*, wie bereits erwähnt, nur wenige nNOS-immunpositive Zellen. Deutlich erkenntlich ist dies vor allem im medialen Bereich des Nucleus (ARCM, siehe *Abbildung 33B*). Im lateralen Bereich der Struktur (ARCL) konnten hingegen sowohl nNOS- als auch APJ-immunreaktive Zellen detektiert werden. Hier konnten auch vereinzelte Co-Lokalisationen und häufiger entsprechende Co-Distributionen von APJ- und nNOS-IR Perikaryen beobachtet werden (*Abbildung 33C+E*). Aufgrund der ausgeprägten Dichte an APJ-IR Faserstrukturen zeigte sich auch eine Co-Distribution mit den nNOS-immunpositiven Neuronen. Bei der quantitativen Analyse der Co-Lokalisation im ARC (*Abbildung 34B*) ergaben sich wie beim SOR Unterschiede in den beiden ermittelten Verhältnissen (APJ/Co-Lok. $58,3 \pm 13,0\%$ bzw. nNOS/Co-Lok. $6,6 \pm 2,9$ %) welche durch die niedrige absolute Zahl an nNOS positiven Zellen in dieser Struktur bedingt waren.

2. Co-Expression des APJ-Rezeptors mit Neuropeptiden in der HZL-Kultur

Der Zwischenlappen der Rattenhypophyse (HZL) als endokrine Drüsenstruktur produziert vornehmlich peptiderge Faktoren des POMC-Gens wie α -MSH, ACTH, CLIP oder β -Endorphin (Mains und Eipper, 1979). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine HZL-spezifische Biosynthese von PACAP (Kimura et al., 1994) und Apelin (Reaux-Le Goazigo et al., 2007) in dieser Struktur. Im Grenzbereich zum Hypophysenvorderlappen konnte darüber

hinaus auch nNOS nachgewiesen werden (Crack et al., 1997). Die ausgeprägte zelluläre Expression des Apelin-Rezeptors APJ im Bereich des gesamten Zwischenlappens (*siehe Kap. II.1.2. und II.4.2.*) sowie die erfolgte Etablierung einer HZL-Primärkultur legten eine detaillierte Studie zur quantitativen Erfassung möglicher Co-Expressionsmuster für APJ und einiger der genannten peptidergen Faktoren in der HZL-spezifischen Primärkultur nahe. Um jeweils immuncytochemische Doppelmarkierungen durchführen zu können, war es erforderlich sowohl den APJ-R als auch den APJ-G Antikörper einzusetzen, ebenso den nNOS-R bzw. auch den nNOS-M Antikörper (*siehe Kap. II.1.2.*).

Ziel dieser Untersuchungen war es einerseits, den jeweiligen prozentualen Anteil der für die einzelnen peptidergen Faktoren sowie nNOS und APJ immunpositiven Zellen in der HZL-Primärkultur an der Gesamtzellpopulation eines Wells zu ermitteln. Weiterhin sollte der Anteil der für die einzelnen Faktoren (nNOS, PACAP, Apelin12, ACTH) immunpositiven Zellen erfasst werden, welche zusätzlich den APJ-Rezeptor exprimierten. Dazu wurde das Verhältnis von Zellen, welche jeweils immuncytochemisch doppelmarkiert waren zur Gesamtzahl der für die einzelnen Markierungen immunpositiven Zellen ermittelt. Die entsprechenden Auswertungen hierzu sind in *Abbildung 35* dargestellt. Wie schon in *Kap. II.1.2* beschrieben, erwiesen sich 25-30 % der HZL-Zellen als immunpositiv für den APJ-Rezeptor, unanhängig davon, ob APJ-G oder APJ-R Antikörper eingesetzt wurde. Der prozentuale Anteil der nach Verwendung des nNOS-R Antikörpers als, nNOS-positiv ermittelten Zellen lag mit $16,2 \pm 6,6$ % aller HZL-Zellen eines Wells niedriger als die mit dem nNOS-M Antikörper markierten Zellen mit einem Anteil von $29,0 \pm 11,9$ % aller mit DAPI als Kernfarbstoff markierten Zellen. Für die Neuropeptide ergab sich der höchste Anteil an immunreaktiven Zellen mit $40,5 \pm 7,3$ % der ausgezählten Zellen für PACAP38, gefolgt von Apelin 12 ($33,1$ %) und ACTH ($25,8 \pm 10,1$ %).

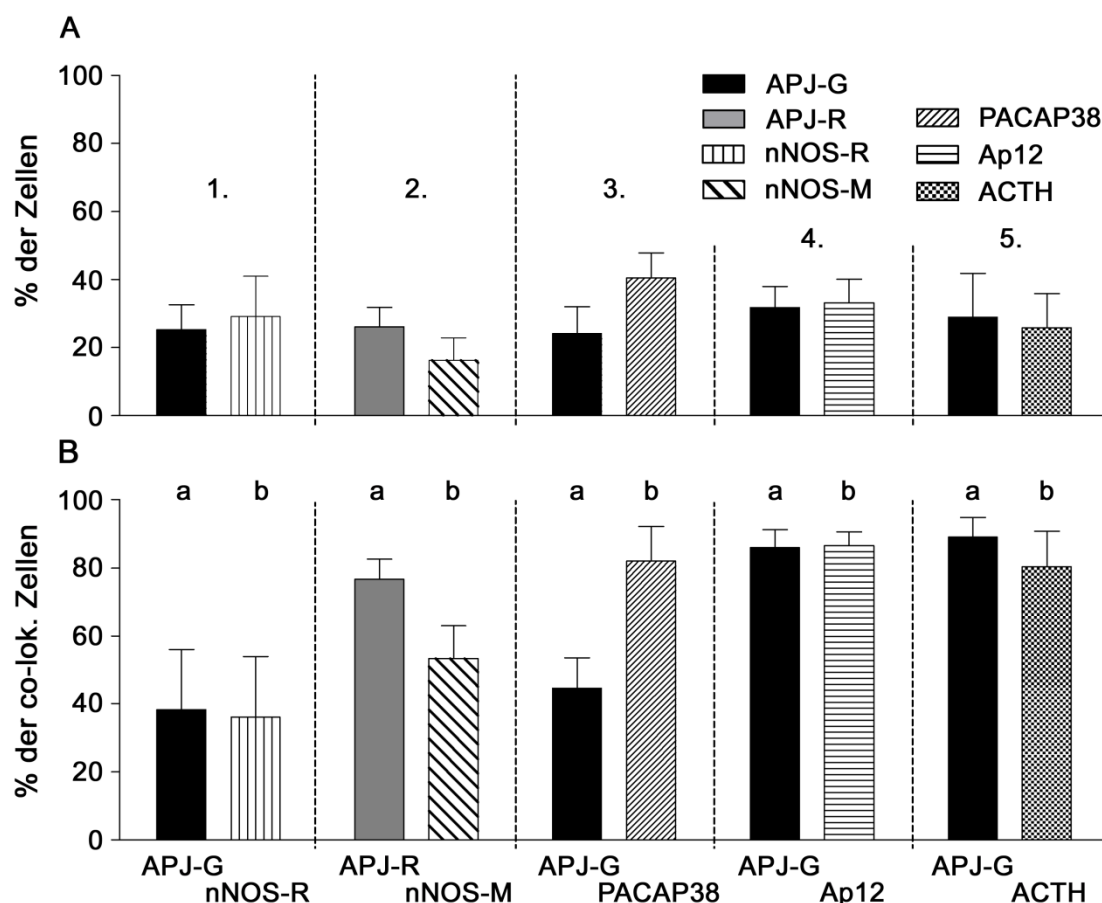


Abbildung 35: Quantitative Evaluation der Doppelcytofluoreszenzmarkierungen für APJ mit verschiedenen Neuropeptiden an primär kultivierten Hypophysenzwischenlappenzellen (HZL).

Quantitative Evaluation aus randomisierten Bildausschnitten von immunhistochemisch mit jeweils verschiedenen Antikörperkombinationen (APJ-G+nNOS-R (1.); APJ-R+nNOS-M (2.); APJ-G+PACAP38 (3.); APJ-G+Apelin12 (4.); APJ-G+ACTH (5.)) markierten HZL-Zellen. (A) Anteil der für das jeweilige Neuropeptid, für APJ oder nNOS immunpositiven Zellen an der Gesamtzellzahl des ausgewerteten Bildausschnitts. (B) Verhältnis von immuncytochemisch doppelmarkierten Zellen zur Anzahl der für die jeweils einzelnen Markierungen positiv ausgezählten Zellen (co-lok./x). Prozentualer Anteil doppelmarkierter Zellen an der Gesamtzahl (a) APJ-exprimierender Zellen und (b) Neuropeptid/nNOS exprimierender Zellen. Markierung aller Zellkerne mit DAPI. Zur Auswertung wurden aus vier unabhängigen Präparationen jeweils 4-6 mikroskopisch vergrößerte (20x), Bildausschnitte verwendet. -G= Antikörper host Ziege, -R = host Kaninchen, -M = host Maus; nNOS = neuronale NO-Synthase; PACAP = pituitary adenylate cyclase activating peptide; Ap12 = Apelin12; ACTH = Adrenocorticotropes Hormon. Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.E.M. dargestellt.

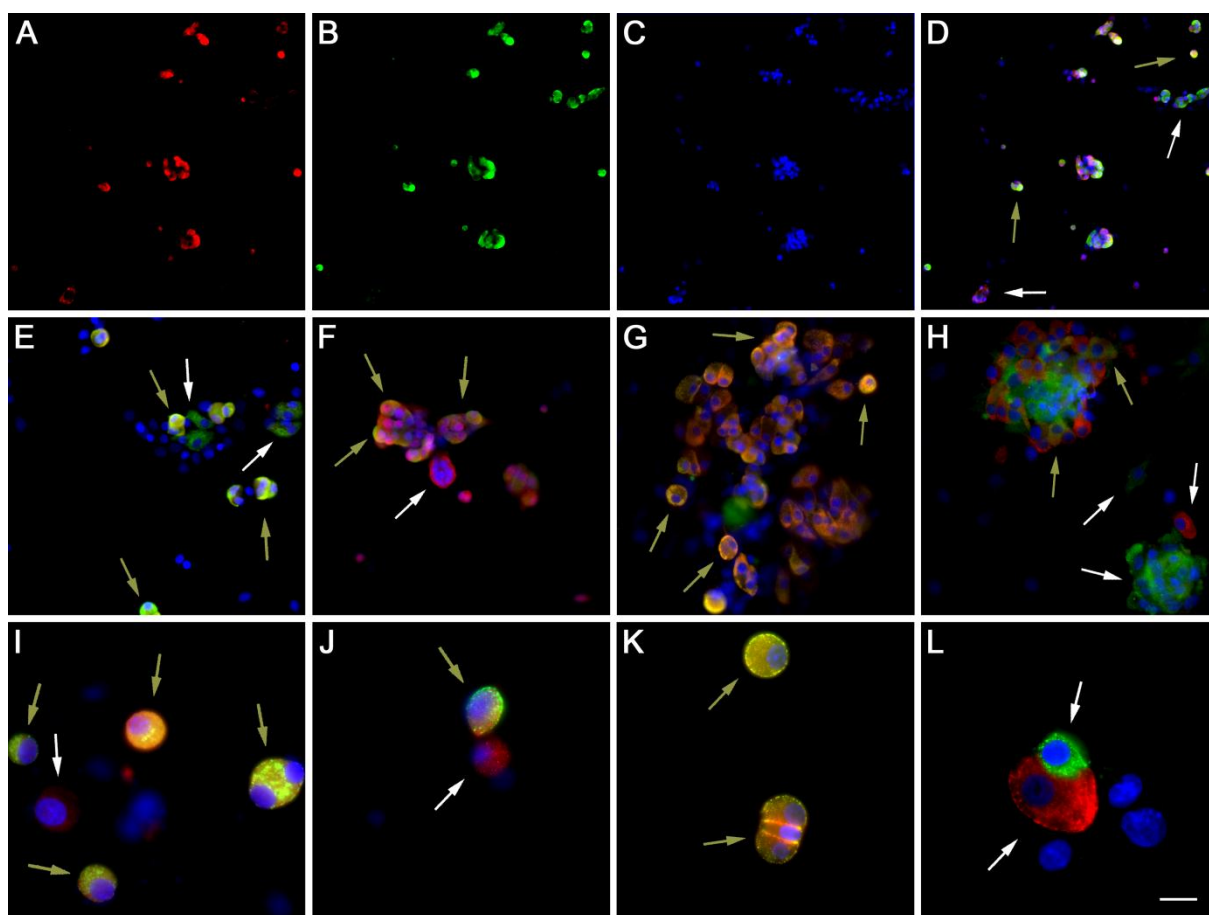


Abbildung 36: Immunocytochemische Doppelmarkierungen an primär kultivierten Zellen des Hypophysenzwischenlappens

Nachweis der Co-Expression von APJ mit nNOS, PACAP38 und Apelin12 durch immunocytochemische Markierung mit polyclonalem rabbit anti-APJ bzw. goat anti-APJ und mouse anti-nNOS, rabbit anti-PACAP oder rabbit anti-ACTH als Primärantikörper. Verwendete Sekundärantikörper siehe MM Tab.4. (A-D) Immunfluoreszenzsignale für APJ-G (rot), ACTH (grün), Zellkernfärbung mit DAPI (blau) und Überlagerungsbild. Exemplarische, co-lokalisierte (gelb) und nicht co-lokalisierte Zellen (weiß) sind mit den entsprechenden Pfeilen gekennzeichnet. (E-L) Doppelmarkierungen von (E-H) Zellgruppen und (I-L) einzelnen Zellen. (E+I) APJ-G (rot) und ACTH (grün); (F+J) PACAP (rot) und APJ-G (grün); (G+K) Ap12 (rot) und APJ-G (grün); (H+L) APJ-G (rot) und nNOS-M (grün). Größenmarker: A-D 100µm; E-H 50µm; I-L 20µm. Abkürzungen: -G = Antikörper host Ziege, -M = host Maus; nNOS = neuronale NO-Synthase; PACAP = pituitary adenylate cyclase activating peptide; Ap12 = Apelin12; ACTH = Adrenocorticotropes Hormon

Die Auswertung der Verhältnisse (1.) des prozentualen Anteils immunocytochemisch für ein Neuropeptid bzw. nNOS und APJ doppelmarkierter Zellen an der Gesamtzahl APJ-exprimierender Zellen bzw. (2.) des prozentualen Anteils immunocytochemisch für ein Neuropeptid bzw. nNOS und APJ doppelmarkierter Zellen an der Gesamtzahl Neuropeptid/nNOS exprimierender Zellen ist in *Abbildung 35B* dargestellt. Im folgenden Teil

werden jedoch nur die Anteile für (2.) dargestellt. So ergaben sich für die Anteile von co-lokalisierten Zellen zu nNOS-R $36,1 \pm 17,8$ %. Das bedeutet, dieser Anteil der nNOS-positiven Zellen exprimierte auch den APJ-Rezeptor. Bei der darauffolgenden Auswertung wurden ebenfalls APJ und nNOS allerdings mit zwei verschiedenen Antikörpern (APJ-R/nNOS-M) markiert. Hierbei ergab sich ein Anteil von $53,3 \pm 9,6$ % für das Verhältnis von co-lokalisierten Zellen zu nNOS-M-immunreaktiven Zellen, also dem Verhältnis von nitrergen Zellen, welche sich auch für den APJ-Rezeptor positiv zeigten (*Abbildung 35B*). Bei den für PACAP38-immunpositiven Zellen konnte hingegen mit $81,9 \pm 10,2$ % ein deutlich höherer Anteil an APJ-positiven Zellen dieser Population ermittelt werden. Der Anteil, welcher sich neben Apelin auch für APJ immunreaktiv zeigte, war mit $86,4 \pm 3,5$ % ebenfalls sehr hoch ausgeprägt. Der Anteil an ACTH-immunreaktiven Zellen, welcher auch den Rezeptor exprimierte, war mit $80,2 \pm 10,6$ % ähnlich deutlich ausgeprägt.

Exemplarische fotografische Aufnahmen aller in *Abbildung 35* ausgewerteten Doppel-fluoreszenzen sind in *Abbildung 36* dargestellt. Eine Markierung für APJ, ACTH der Zellkernfärbung DAPI und dem Überlagerungsbild aller drei Kanäle ist beispielhaft in *Abbildung 36A-D* dargestellt. In diesem Bildausschnitt ist auch hohe Grad an Co-Lokalisierung der APJ- und ACTH-Signale in vielen der Zellgruppierungen zu erkennen. Dies ist an der durch die Überlagerung der zwei Farbsignale gelbliche Färbung der Zellen zu erkennen. Im Überlagerungsbild aller Kanäle (*Abbildung 36D*) ist dies an einigen Beispielen mit einem gelben Pfeil illustriert. Nicht co-lokalisierte, nur APJ- oder ACTH-positive Zellgruppen sind hingegen mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. In *Abbildung 36E+I* ist die gleiche Markierung nochmals in höherer bzw. höchster Vergrößerung dargestellt. Anhand dieser ist der hohe Anteil an Co-Lokalisation von ACTH und APJ noch besser ersichtlich. Ähnlich hohe Übereinstimmungen der zellulären Signale zeigten sich auch bei den beiden Vergrößerungen für die Doppelmarkierung mit PACAP und APJ (*Abbildung 36E+F*) und Apelin12 mit APJ (*Abbildung 36G+K*). Im Gegensatz dazu ergab sich deutlich geringere Co-Lokalisation von APJ mit nNOS. Gut ersichtlich ist dies vor allem an der in *Abbildung 36F* dargestellten Zellansammlung.

IV. Funktionale Studien in der Zellkultur

1. PVN- und MnPO-angereicherte neonatale Primärkultur

Durch die detaillierte Immunfluoreszenz-Kartierungsstudie für APJ im ZNS der Ratte (Tabelle 10) konnte eine ausgeprägte Expression des APJ-Rezeptors in zahlreichen (extra-) hypothalamischen Strukturen nachgewiesen werden. Dazu zählten unter anderem der *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus (PVN) und der *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO). Beide Kerngebiete stellen bedeutende integrative Zentren für die Perzeption afferenter Signalinformationen im Rahmen homöostatischer Regelkreise etwa zur Konstanzhaltung der Körpertemperatur, des Salz- und Wasserhaushaltes sowie des Energiestoffwechsels dar. Die Erstellung einer MnPO-angereicherten neuroglialen Primärkultur aus dem Gehirngewebe neonataler Ratten war am Institut bereits etabliert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zusätzlich das Protokoll für eine PVN-angereicherte Primärkultur erarbeitet. Zur Identifikation der korrekten Excisionsstelle bei Erstellung dieser Kultur (siehe MM Kap. 1.1.5) wurden histologische Kresylviolett-färbungen (MM Kap. 1.1.4.3) des verwendeten Frischgewebeschnitts und regelmäßig immunocytochemische, PVN-spezifische Markierungen für CRF an der Kultur vorgenommen (MM Kap. 1.1.6). Beide neuroglialen Primärkulturen wurden für die folgenden Versuche (Kap. 1.1-1.4) verwendet.

1.1 Modulation der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) nach Apelin-Stimulation

Die Primärkulturen des MnPO bzw. PVN enthielten zumindest die vier prominentesten Zelltypen neuroglialen Gewebes. Um Untersuchungen zur Apelin-induzierten, intrazellulären Signaltransduktion bei eindeutiger Zuordnung der Daten zu dem einen oder anderen Zelltyp durchführen zu können, repräsentierte die *online* Analyse der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) als *second* oder gar *third messenger* die geeignetste Methode. Darüber hinaus könnte dadurch auch eine direkte oder indirekte Öffnung Liganden- oder *second messenger* aktivierter Kationenkanäle in der Zellemembran erfasst werden (Burnashev, 1998). Kürzlich veröffentlichte Pilotversuche zur Apelin-stimulierten Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ an

frisch isolierten, magnozellulären Neuronen des SON deuteten auf eine mögliche Funktion von intrazellulären Calcium als *second messenger* hin (Tobin et al., 2008).

Aufgrund dessen sollte vor allem an Neuronen und Astrozyten, limitiert auch Mikrogliazellen, der PVN- und MnPO-angereicherten Primärkulturen die Beteiligung von Calcium an einem möglichen sekundären Signalweg des apelinergen Systems auch auf Einzelzellebene anhand der Technik des Calcium-Imaging untersucht werden. Dazu wurden die auf Cellocate® Deckgläschen befindlichen Primärkulturzellen mit unmittelbar vor der Messung vorgewärmtem (37 °C) Messpuffer kontinuierlich superfundiert, und PyrAp13 bzw. Glutamat in einer Endkonzentration von 10^{-6} mol/l bzw. 10^{-5} mol/l für jeweils 3 min zugesetzt. Zunächst durchgeführte Superfusionen mit steigender Konzentration an PyrAp13 (10^{-8} - 10^{-6} mol/l) wurden aufgrund der geringen Responsivität der Zellen wieder eingestellt. Alle weiteren Versuche wurden deshalb bei einer gleichbleibenden PyrAp13 Konzentration von 10^{-6} mol/l durchgeführt. Eine Auflistung aller in die Datenauswertung aufgenommenen Zellen der beiden Primärkulturen sowie der jeweils durch PyrAp13 (10^{-6} mol/l) stimulierbaren Zellen ist in *Tabelle 11* dargestellt.

In Bezug auf Neurone lag der Anteil PyrAp13-responsiver Zellen in der PVN-angereicherten Kultur bei 3,9 % und in der MnPO-angereicherten bei 8,8 %. Das Antwortverhalten der Astrozyten aus beiden Zellkulturen lag mit 4,8 % bzw. 1,8 % auf vergleichbar niedrigem Niveau. Von den 73 analysierten Mikrogliazellen der PVN-spezifischen Primärkultur erwiesen sich 12,3% als responsiv, wohingegen keine der lediglich drei untersuchten Mikrogliazellen der MnPO-angereicherten Primärkultur auf apelinerge Stimulation mit einer Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ reagierten. Nur für die Oligodendrozyten des PVN ergab sich eine Quote von 28 %, wobei hier jedoch insgesamt nur sieben Zellen analysiert wurden.

Tabelle 11: Anzahl der nach Zelltyp sortierten, insgesamt analysierten sowie auf Stimulation mit PyrAp13 (10^{-6} mol/l) responsiven Zellen. Das zelluläre Antwortverhalten = Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurde ab einer Ratioänderung (340/380nm) von $\geq 0,05$ bei der Datenauswertung berücksichtigt.

Zelltyp	analysierte Zellen		responsive Zellen	
	PVN	MnPO	PVN	MnPO
Neurone	411	216	14	14
Astrozyten	188	166	8	4
Mikrogliazellen	73	3	9	0
Oligodendrozyten	7	16	2	0

Die durchschnittliche Antwortstärke der auf eine PyrAp13 Stimulation (10^{-6} mol/l) responsiven Zellen erwies sich bei den Neuronen der PVN- bzw. der MnPO-Primärkultur mit einer mittleren Ratioänderung von $0,096 \pm 0,014$ bzw. $0,090 \pm 0,014$ als vergleichbar ausgeprägt (*Abbildung 37A*). Im Gegensatz dazu ergab sich ein wesentlich größerer Unterschied im Vergleich von Neurogliazellen der beiden Kulturen. So zeigten die Astrozyten der MnPO-Kultur mit marginalen Ratioänderungen von $0,055 \pm 0,001$ eine wesentlich geringere Aktivierbarkeit nach der Superfusionsstimulation mit PyrAp13 als Astrozyten der PVN-Kultur ($0,256 \pm 0,089$). Die zwei responsiven Oligodendrozyten (Mittelwert: 1,140) ebenfalls der PVN-Kultur zeigten eine im Mittel deutlich größere Ratioänderung als die Mikrogliazellen ($0,082 \pm 0,019$) der gleichen Kultur.

1.2 Apelinerge Modulation des glutamatergen Antwortverhaltens

Glutamat spielt in Neuronen durch Bindung an ionotrope und metabotrope Rezeptoren eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der meisten neuroendokrinen homöostatischen Systeme (Eyigor et al., 2001; Ullrich-Lai et al., 2010). Eine mit der glutamatergen Innervation verbundene Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration ist unter anderem in den magnozellulären Neuronen des PVN wichtig für die Kontrolle ihrer phasischen Aktivität und der nachfolgenden Freisetzung von Vasopressin (Iremonger et al., 2010; Israel et al. 2010). Auch im MnPO konnte den AMPA/Kainat Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der nachfolgenden Sekretion von Vasopressin aus dem efferent angesteuerten PVN und somit der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes nachgewiesen werden (Yamaguchi und Yamada, 2006). Die hypothalamische Kontrolle der Temperaturregulation betreffend, repräsentiert die glutamaterge Innervation des MnPO eine der Endstrecken afferenter Signaltransduktion peripherer Thermorezeptoren (Morrison und Nakamura, 2011).

In den gemessenen Primärkulturen fiel beim Vergleich der Ratio nach Stimulation mit PyrAp13 (10^{-6} mol/l) zu einer Stimulation mit Glutamat (10^{-5} mol/l) die Änderung und somit der erfolgte Calciumeinstrom deutlich höher aus. Dies ist unverkennbar ersichtlich an einer Imaging-Aufnahme eines einzelnen Neurons aus der PVN-angereicherten Kultur (*Abbildung 37B*).

Neuropeptide zeigen darüber hinaus häufig keine eigene Transmitteraktivität auf Neurone bzw. Gliazellen, sondern fungieren lediglich als Neuromodulatoren, welche die synaptische

Aktivität klassischer Neurotransmitter wie zum Beispiel Glutamat oder GABA, wie die Bezeichnung schon andeutet, modulierend beeinflussen (van den Pol et al., 1998b; Gao und van den Pol, 2001; Bacci et al., 2002).

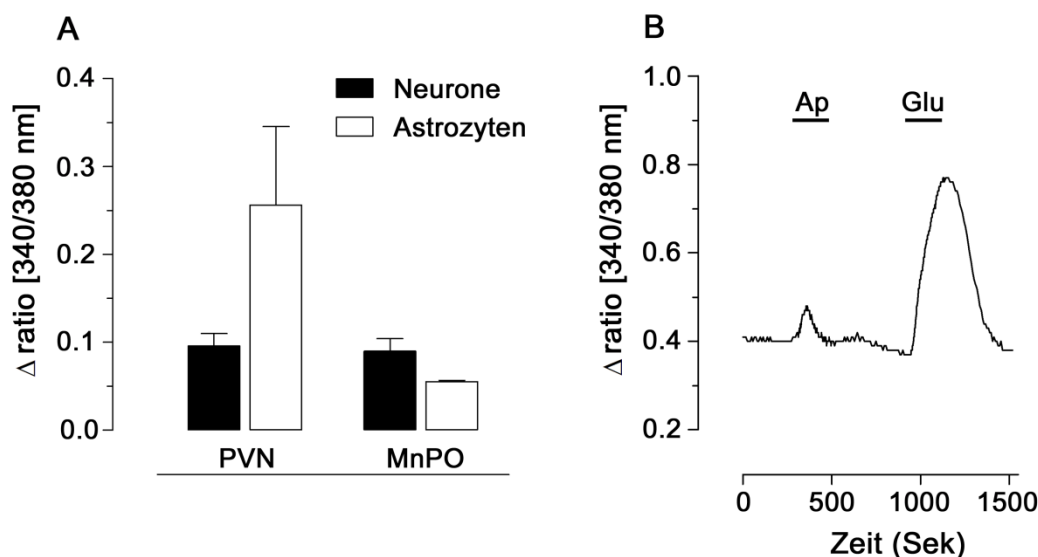


Abbildung 37: Antwortverhalten einzelner Zellen der PVN- und MnPO-angereicherten neuroglialen Primärkulturen als Ratioänderung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) auf Superfusionsstimulation mit PyrAp13.

(A) Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, dargestellt als Δ Ratiowerte (340/380nm) einzelner primär kultivierter Neurone (schwarze Balken) und Astrozyten (weiße Balken) des Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (PVN) und des Nucleus praeopticus medianus (MnPO) nach 3-minütiger Superfusionsstimulation mit PyrAp13 (10^{-6} mol/l). PVN Neurone: $n=14$, Astrozyten: $n=8$; MnPO Neurone: $n=14$, Astrozyten: $n=4$. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M. (B) Exemplarische Aufzeichnung der intrazellulären Calciumsignale eines einzelnen PVN-Neurons nach jeweils 3-minütiger Stimulation mit PyrAp13 (Ap, 10^{-6} mol/l) und Glutamat (Glu, 10^{-5} mol/l).

In der nachfolgenden Versuchsreihe wurde deshalb der Einfluss von PyrAp13 auf ein durch den klassischen Transmitter Glutamat hervorgerufenen, intrazelluläres Calciumsignal untersucht. Dazu wurde ein sequenzielles Stimulationsprotokoll benutzt, das heißt, die zu messenden Zellen wurden zunächst mit PyrAp13 (10^{-6} mol/l), dann mit Glutamat (10^{-5} mol/l) und anschließend mit der Kombination aus beiden superfundiert. Zum Abschluss erfolgte ein erneuter, alleiniger Glutamatstimulus. Zwischen den einzelnen Stimulationsperioden wurden die Primärkulturen für jeweils acht min mit Messpuffer zur Auswaschung des jeweiligen Neurotransmitters/Neuromodulators superfundiert.

Je nach Antwortverhalten auf den kombinierten Stimulus, im Vergleich zur vorhergehenden sowie nachfolgenden Superfusionsstimulation mit Glutamat alleine, konnten die Zellen sowohl der PVN- als auch der MnPO-Kultur nach der immunocytochemischen Bestimmung ihres Zelltyps in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden.

Bei einem Teil der Neurone und Astrozyten kam es sowohl in der PVN- als auch in der MnPO-Kultur zu einer Abschwächung des durch Glutamat bedingten Calciumsignals bei gleichzeitiger Stimulation mit PyrAp13. Im Gegensatz dazu wurden auch Zellpopulationen ebenfalls beider Zelltypen und in beiden Kulturen ermittelt, die durch eine gleichzeitige Stimulation mit PyrAp13 und Glutamat, eine Verstärkung des glutamaterg bedingten Calciumsignals zeigten. Die Auswertung dieser Gruppen in den beiden unterschiedlichen Kulturen ist in *Abbildung 38* dargestellt. Der größte Teil der Zellen zeigte jedoch auf den kombinierten Stimulus aus PyrAp13 und Glutamat im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Glutamat keine Veränderung des Calciumsignals und somit keine Modulation desselben (*Abbildung 39*).

Allgemein war im Vergleich der beiden Primärkulturen bei der PVN-Kultur eine im Mittel größere, durch Glutamat induzierte, Ratioänderung und somit eine ausgeprägtere Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ als bei der MnPO-Kultur zu beobachten. Weiterhin antworteten in allen Gruppen (außer der abschwächend modulierten Gruppe der PVN-Kultur, *Abbildung 38A*) die Neurone auf alle drei sequenziellen Glutamatstimuli mit stärkeren Calciumsignalen als die Astrozyten.

Die Abschwächung des glutamatergen Calciumsignals durch gleichzeitige Superfusionsstimulation mit PyrAp13 war beim Vergleich der beiden Primärkulturen unterschiedlich stark ausgeprägt. So konnte in den PVN-angereicherten neuroglialen Kulturen eine schwächer ausgeprägte, PyrAp13-vermittelte Absenkung der Δ -Ratiowerte als in den Zellen der MnPO-Kultur registriert werden (*Abbildung 38A+C*).

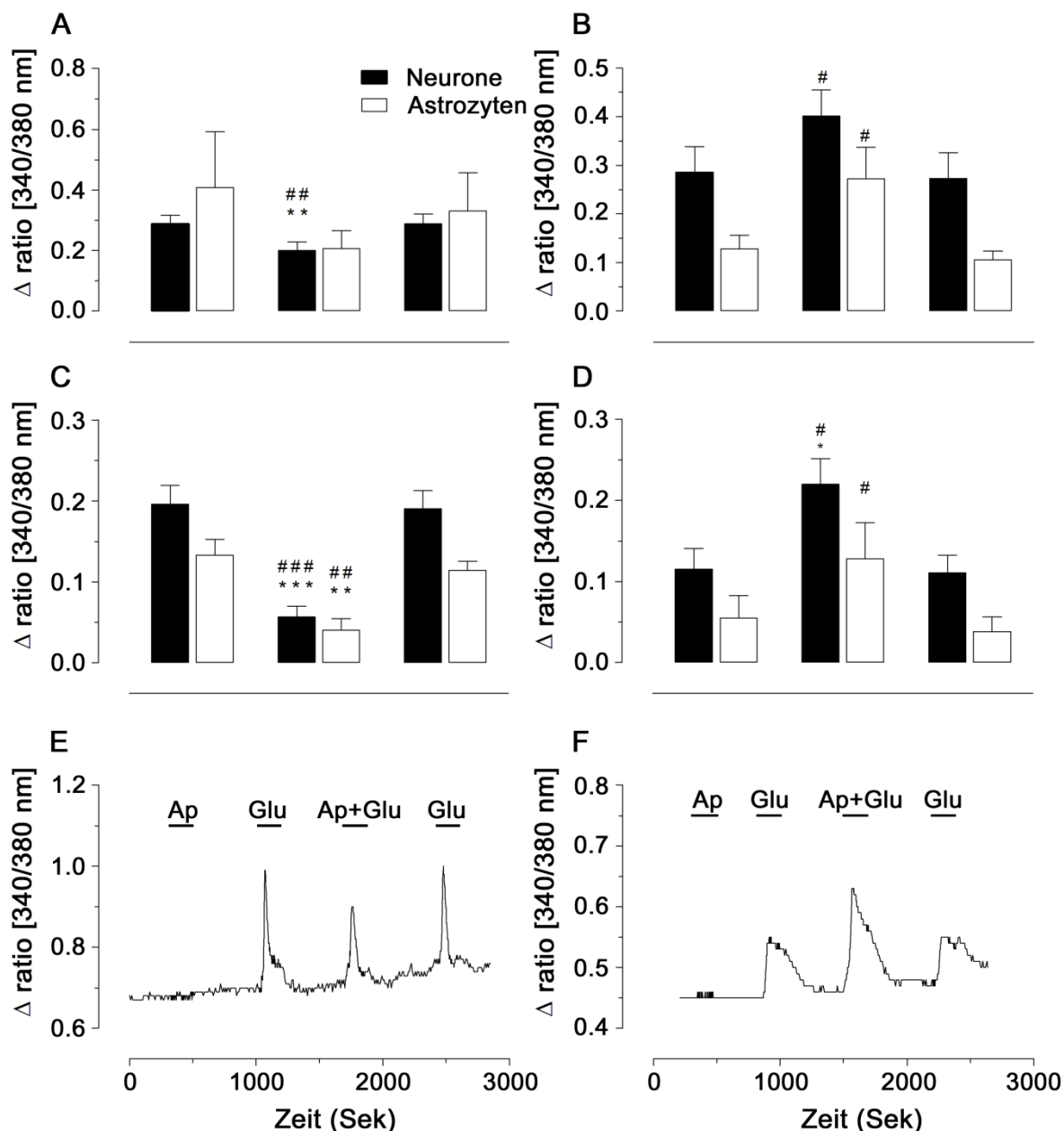


Abbildung 38: Modulation des glutamaterg bedingten intrazellulären Calciumsignals durch PyrAp13 in Zellen der PVN- und MnPO-angereicherten neuroglialen Primärkultur der Ratte.

Intrazelluläre Calciumsignale von Neuronen (schwarze Balken) und Astrozyten (weiße Balken) der PVN- und MnPO-Kulturen. Die Zellen wurden sukzessive für je drei min mit Glutamat (Glu, 10^{-5} mol/l) alleine, Glutamat zusammen mit 10^{-6} mol/l PyrAp13 (Ap+Glu) und wieder mit Glutamat alleine superfusionsstimuliert. (A+C) Abschwächung und (B+D) Verstärkung glutamaterger Calciumsignale durch PyrAp13 in der neuroglialen (A+B) PVN-Kultur bzw. (C+D) MnPO-Kultur. (E+F) Exemplarische Calcium-Imaging Aufnahmen einzelner Astrozyten für (E) die Abschwächung und (F) die Verstärkung der durch Glutamat bedingten Calciumsignale. Alle Daten (A-D) repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M. Statistische Signifikanzanalyse: Mann-Whitney U-test. # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ und ### $p \leq 0,001$ PyrAp13+Glutamat versus zweite Glutamat-Antwort oder *-*** im Vergleich zum ersten Glutamat-Stimulus. A: Neurone (N) $n=30$, Astrozyten (A) $n=7$; B: (N) $n=14$, (A) $n=4$; C: (N) $n=16$, (A) $n=10$; D: (N) $n=6$, (A) $n=5$.

Mit einer Ratioänderung von $0,200 \pm 0,028$ konnte bei ersterer nur in den der Gruppe zugeteilten Neuronen eine signifikante Abschwächung des Calciumsignals verglichen mit den Δ -Ratiowerten bei alleiniger Glutamat-Stimulation von $0,288 \pm 0,029$ vor und $0,288 \pm 0,032$ nach dem kombinierten Reiz festgestellt werden (jeweils $p \leq 0,01$; *Abbildung 38A*). Für die Astrozyten der PVN-Kultur ließ sich eine tendenzielle, statistisch aufgrund der geringen Zellzahl und hoher Schwankungsbreite der Einzelwerte jedoch nicht signifikante ($p > 0,05$) Reduktion der durch Glutamat induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ aufzeigen.

Eine deutlich ausgeprägte Absenkung der Δ -Ratiowerte gegenüber denen nach alleiniger Glutamatstimulation ergab sich dagegen sowohl bei den Neuronen als auch den Astrozyten der MnPO-Kultur (*Abbildung 38C*). Im Falle der MnPO-spezifischen Neurone erwiesen sich die Δ -Ratiowerte von $0,057 \pm 0,013$ gegenüber den während beider Kontrollstimuli mit Glutamat alleine ($0,196 \pm 0,023$ und $0,190 \pm 0,023$) als markant erniedrigt (jeweils $p \leq 0,001$, *Abbildung 38C*). Dies war auch der Fall für die analysierten Astrozyten dieser Kultur, wobei in dieser Gruppe die Differenz aufgrund von allgemein etwas niedrigeren Ratiowerten der Kontroll-Glutamatstimuli, geringer ausfiel ($0,040 \pm 0,015$ versus $0,133 \pm 0,020$ und $0,114 \pm 0,012$; mit jeweils $p \leq 0,01$).

Ähnlich den Zellpopulationen mit einer auf den kombinierten Stimulus (Glutamat+PyrAp13) abgeschwächten Erhöhung der glutamaterg induzierten Calciumsignale, zeigten sich auch bei den Zellen, welche auf den kombinierten Stimulus mit einer Verstärkung des glutamatergen Calciumsignals reagierten, im Vergleich der beiden Primärkulturen eine in der MnPO-Kultur stärker ausgeprägte Modulation (*Abbildung 38B+D*).

Die positiv modulierte Gruppe von Neuronen dieser Kultur zeigte bei Superfusionsstimulation mit Glutamat+PyrAp13 ($0,220 \pm 0,031$) eine signifikante Verstärkung des glutamaterg bedingten Calciumsignals verglichen mit den beiden alleinigen Glutamatstimuli ($0,115 \pm 0,025$ bzw. $0,111 \pm 0,022$) (jeweils $p \leq 0,05$; *Abbildung 38D*). Bei den Astrozyten dieser Gruppe hingegen erwies sich die aufgetretene Verstärkung ($0,128 \pm 0,044$) nur gegenüber dem nachfolgenden Glutamat-Reiz als signifikant ausgeprägt ($0,038 \pm 0,018$; $p \leq 0,05$).

In der PVN-Kultur zeigte das Mittel der Ratioänderungen nach dem kombinierten Stimulus sowohl von Neuronen als auch Astrozyten ebenfalls nur gegenüber dem nachfolgenden

Glutamatstimulus eine signifikante Änderung (jeweils $p \leq 0,05$; *Abbildung 38B*). So erwies sich die Verstärkung des glutamaterg bedingten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ bei gleichzeitiger Stimulation mit PyrAp13 in den Neuronen dieser Kultur mit $0,401 \pm 0,053$ gegenüber $0,273 \pm 0,053$, bzw. in den Astrozyten mit $0,273 \pm 0,065$ verglichen mit $0,105 \pm 0,018$ als signifikant. Entsprechende Beispiele für die beiden Modulationstypen sind in *Abbildung 38E+F* als Originalaufnahme des Calcium-Imaging zweier unterschiedlicher Astrozyten der PVN-Kultur dargestellt.

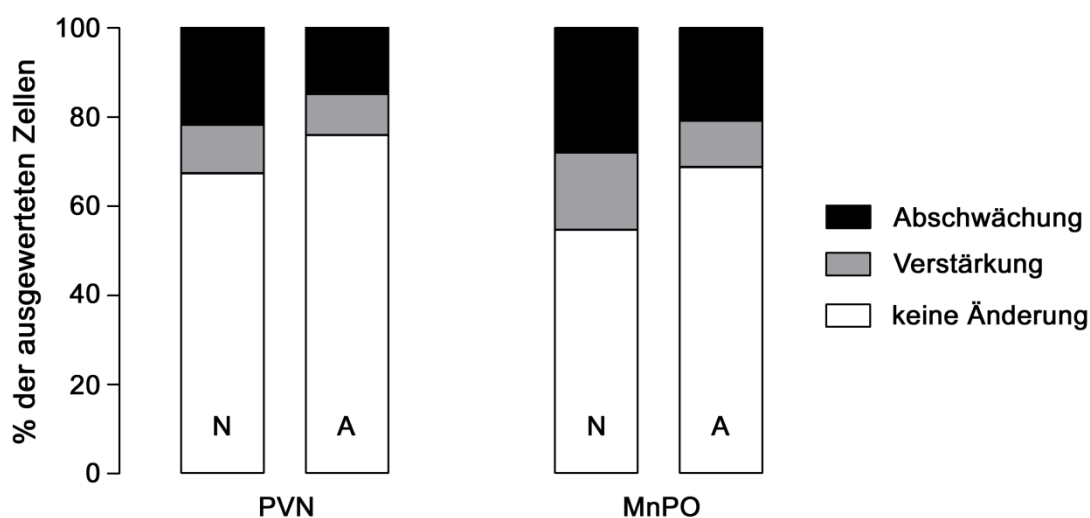


Abbildung 39: Modulation der Glutamat-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch PyrAp13 in Zellen der PVN- und MnPO-angereicherten neuroglialen Primärkultur der Ratte

Neurone (N) und Astrozyten (A) der MnPO- und PVN angereicherten Kulturen wurden sequentiell für jeweils drei min zuerst mit Glutamat (10^{-5} mol/l), dann mit Glutamat und PyrAp13 (10^{-6} mol/l) sowie anschließend wieder mit Glutamat alleine superfusionsstimuliert. Die Einteilung der Neurone und Astrozyten in die Gruppen erfolgte nach Vergleich des Antwortverhaltens des kombinierten Stimulus mit dem vorhergegangen und darauf folgendem alleinigen Glutamat-Stimulus. Prozentuale Verteilung der Zellen ohne Modulation des glutamatergen Calciumsignals, mit verstärkter bzw. abgeschwächter Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten Zellen. PVN (N) $n=147$, (A) $n=48$; MnPO (N) $n=75$, (A) $n=54$.

Die in dieser Studie gewonnen Ergebnisse einer signifikanten Modulation Glutamat-induzierter Calciumsignale in MnPO- und PVN-spezifischen Astrozyten und vor allem Neuronen durch PyrAp13 sind in *Abbildung 39* zusammengefasst. Sie zeigt für beide neuroglialen Primärkulturen den Anteil von positiv und negativ modulierten Neuronen und Astrozyten sowie der jeweiligen Zellen mit unveränderten Δ -Ratiowerten an der Gesamtzahl der evaluierten und in die Datenanalyse übernommenen Zellen. Dabei konnte in der PVN-

Kultur bei 67 bzw. 75 % aller untersuchten Neurone bzw. Astrozyten im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Glutamat keine Änderung der Δ -Ratiowerte auf eine kombinierte Stimulation mit Glutamat plus PyrAp13 festgestellt werden. In der MnPO-Kultur erwies sich dieser Anteil mit 54 % für die Neurone und 68 % für die Astrozyten etwas geringer ausgeprägt. In beiden Kulturen fiel der Prozentsatz der nicht-responsiven Zellen für die ausgewerteten Neuronen jeweils geringer aus, als derjenige für die Astrozyten der gleichen Kultur. Weiterhin war im Vergleich pro Zelltyp und Kultur jeweils der Anteil der Zellen, die auf einen kombinierten Stimulus mit einem verstärkten Calciumsignal reagierten niedriger ausgeprägt als der Anteil, welcher eine Abschwächung desselben zeigte (positiv modulierte Zellen PVN: Astrozyten 9,3%, Neurone 10,9%; MnPO: Astrozyten 10,4%, Neurone 17,3%; und negativ modulierte Zellen PVN: Astrozyten 14,8%, Neurone 21,7%; MnPO: Astrozyten 20,8%, Neurone 28,0%).

1.3 Apelinerge Modulation des glutamatergen Calciumsignals in Zellen mit (nicht) nitrerem Phänotyp

In der immunhistochemischen Studie zur Verteilung APJ- und nNOS-immunpositiver Perikaryen und Nervenfasern in hypothalamischen Kerngebieten konnte eine signifikante Co-Expression beider Proteine in Neuronen vor allem des PVN nachgewiesen werden (*Abbildung 32*). Zusätzlich konnte eine hohe Dichte APJ-immunpositiver Nervenfasern und Punctata in unmittelbarer Umgebung zu nNOS-immunpositiven Neuronen des MnPO demonstriert werden. Diese rein histologische Analyse legte die apelinerge Innervation nitrerger Neurone in PVN und MnPO nahe.

Deshalb sollte in einer weiteren Teilstudie die apelinerge Modulation der glutamaterg bedingen Calciumsignale in nitrergen Neuronen der Primärkulturen des PVN und des MnPO untersucht werden. Dazu wurden die in Calcium-Imaging analysierten Zellen zusätzlich zur immunocytochemischen Bestimmung ihres Zelltyps auch hinsichtlich der Expression von nNOS überprüft. Ein Beispiel für eine Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung an primär kultivierten Zellen des MnPO ist in *Abbildung 40* dargestellt. Sie zeigt zwei Map2a+2b-immunreaktive neuronale Zellen (*Abbildung 40A*) mit nNOS-immunpositivem Signal in der

oberen der beiden Zellen (*Abbildung 40B*) und entsprechendem Überlagerungsbild mit Co-Lokalisation von Map2a+b- und nNOS-Immunreaktivität in dieser Zelle (*Abbildung 40C*).

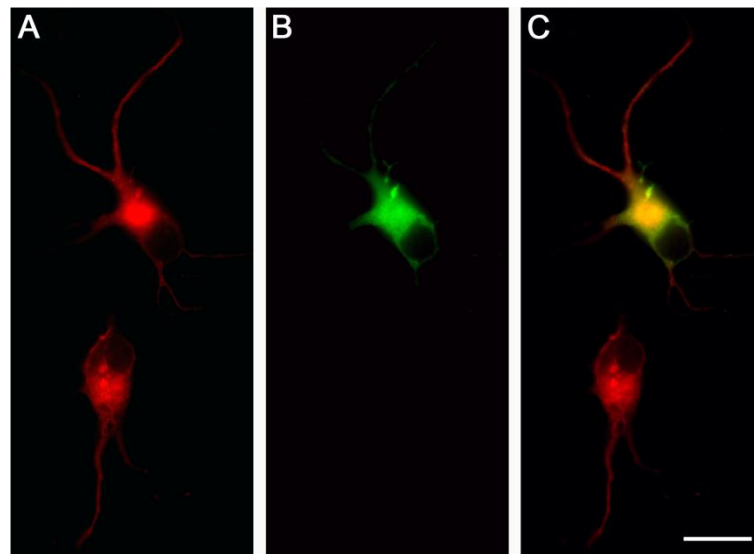


Abbildung 40: Immuncytofluoreszenzmarkierung der MnPO-angereicherten, neuroglialen Primärkultur für neuronale NO-Synthase (nNOS) und MAP2a+2b.

Nachweis der Expression von MAP und nNOS durch Markierung mit mouse anti-MAP2a+2b bzw. rabbit anti-nNOS als Primärantikörper und Cy3-gekoppeltem (rot) donkey anti-mouse IgG bzw. Alexa 488-gekoppeltem (grün) donkey anti-mouse IgG als Sekundärantikörper (A) MAP-immunreaktive Neurone, (B) nNOS-immunpositives Neuron des gleichen Bildausschnitts und (C) Überlagerungsbild mit Co-Lokalisation der beiden Signale in der oberen der beiden Zellen. Größenmarker: 20 μ m

Calcium-Imaging Experimente zur Beurteilung nitrerger Neurone wurden in 19 Wells aus sechs Präparationen für den PVN sowie acht Wells aus drei Präparationen des MnPO durchgeführt. Dabei ergab sich für die PVN-Kultur ein Anteil von 8,2 % und für die MnPO-Kultur von 14,6 % nNOS-positiver Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der charakterisierten Neurone (*Tabelle 12*). In beiden Kulturen zeigte keines der nNOS-positiven Neurone eine direkte Antwort in Form eines Calciumsignals mit Δ -Ratiowerten $> 0,05$ auf die alleinige Stimulation mit PyrAp13. Bei den Immuncytofluoreszenzmarkierungen der PVN-spezifischen Primärkultur konnte kein Neuron, welches durch gleichzeitige PyrAp13-Applikation ein negativ oder positiv moduliertes Glutamat-induziertes Calciumsignals zeigte, als nNOS-positiv getestet werden (*Tabelle 12*). Bei der MnPO-Kultur war dies für die Neurone der negativ modulierten Gruppe ebenso der Fall. Andererseits erwiesen sich zwei von sieben Neuronen der positiv modulierenden Gruppe als nNOS-positiv. Generell ist dabei anzumerken,

dass die absoluten Zahlen der in dieser Teilstudie analysierten Neurone zu gering waren, um eindeutig aussagen zu können, dass vorrangig nicht-nitrerge Neuronen als Zielstruktur für PyrAp13 dienten.

Tabelle 12: Darstellung der Anteile nNOS positiver Neurone an der Gesamtzahl analysierter bzw. in die Auswertung aufgenommener Neurone und an der durch Superfusionsstimulation mit PyrAp13 (10^{-6} mol/l) durch Abschwächung oder Verstärkung des Glutamat-induzierten (10^{-5} mol/l) Calciumsignals reagierenden Zellpopulationen.

	Neurone gemessen gesamt	davon nNOS positiv		Neurone in Aus- wertung		Gruppe Verstärkung Δ -Ratio von Neuronen in Aus- wertung	davon nNOS positiv		Gruppe Ab- schwächung Δ -Ratio von Neuronen in Aus- wertung	davon nNOS positiv
PVN	219	18		79		8	0		17	0
MnPO	130	19		29		7	2		5	0

1.4 PyrAp13 und die Freisetzung LPS-induzierter Cytokine in den neuroglialen Primärkulturen

Im Rahmen der an den neuroglialen Primärkulturen des PVN sowie MnPO durchgeführten Calcium-Imaging Studien konnte zumindest für den PVN eine apelinerge Induktion intrazellulärer Calciumsignale in Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Da Mikrogliazellen wichtige proinflammatorische Cytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) oder Interleukin 6 (IL-6) synthetisieren und diese nach Stimulation mit sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPS) wie dem Lipopolysaccharid (LPS) freisetzen (Wuchert et al., 2008; Ott et al., 2010) sollte in diesem Versuch die LPS-induzierte Cytokinproduktion und ein möglicher modulatorischer Einfluss von PyrAp13 auf dieselbe in der PVN- und der MnPO-angereicherten neuroglialen Primärkultur untersucht werden. Dazu wurden anhand der im Material- und Methodenteil dargestellten Bioassays Messungen der Konzentrationen an bioaktivem IL-6 und TNF- α in den Überständen der Kulturen vorgenommen. Diese Studie stand gleichzeitig in engem Bezug zu den in Kap. V.1. beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen.

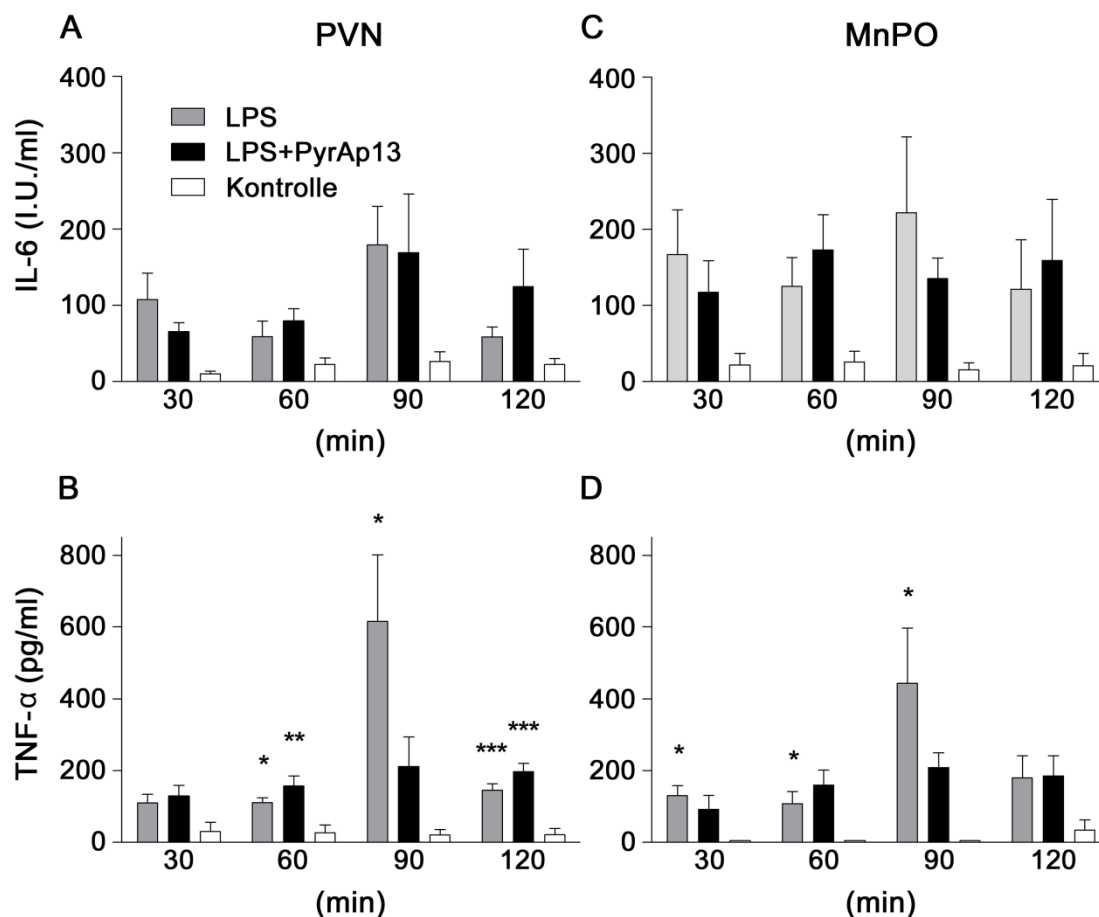


Abbildung 41: Apelinerge Modulation der LPS-induzierten Freisetzung proinflammatorischer Cytokine von primären neuroglialen MnPO- und PVN-Kulturen.

Zellen der neuroglialen Primärkulturen aus PVN (links) und MnPO (rechts) wurden für 30, 60, 90 oder 120 min entweder mit LPS (graue Balken, 100 µg/ml) oder mit LPS+PyrAp13 (schwarze Balken, 10⁻⁶ mol/l) inkubiert. Die Kontrolle (weiße Balken) verblieb ohne Behandlung. Aus den abgenommenen Überständen wurde der Gehalt an bioaktivem TNF-α und IL-6 im Bioassay bestimmt. Menge an bioaktivem (A) IL-6 in I.U./ml und (B) TNF-α in pg/ml in den Überständen der PVN-angereicherten Kultur. (C+D) Entsprechende Cytokin-konzentrationen in der MnPO-angereicherten Kultur. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte ± S.E.M. PVN: n=6-11; MnPO: n=4-7. Statistische Signifikanzanalyse: One-way ANOVA mit Newman-Keuls post-hoc test. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gegenüber Kontrolle.

In Bezug auf das Cytokin IL-6 unterschieden sich in beiden Kulturen die Level von bioaktiven IL-6 in LPS und LPS+PyrAP13-behandelten Zellen zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander sowie der Kontrolle. Trotzdem war in beiden mit LPS-behandelten Gruppen zu allen gemessenen Zeitpunkten eine klare Tendenz zu gegenüber den Kontrollen erhöhten Werten vorhanden. Das Maximum wurde dabei bei den PVN-spezifischen Zellen

nach 90-minütiger Inkubation mit $179,2 \pm 50,5$ I.U./ml (LPS) bzw. $169,2 \pm 76,8$ I.U./ml (LPS+PyrAp13) gegenüber der Kontrolle mit $26,3 \pm 13,0$ I.U./ml erreicht (*Abbildung 41A+C*). Nach 120 min zeigten die mit PyrAp13+LPS behandelten Zellen mit $124,4 \pm 49,0$ I.U./ml tendenziell höhere Level an IL-6 gegenüber den nur mit LPS-stimulierten Zellen mit $58,5 \pm 12,5$ I.U./ml. Diese Tendenz war jedoch ebenfalls nicht signifikant ausgeprägt.

Im Gegensatz dazu konnte durch die Behandlung mit LPS ($100 \mu\text{g/ml}$) bzw. LPS plus PyrAp13 (10^{-6} ml/l) in den Überständen sowohl der PVN- als auch der MnPO-spezifischen Primärkultur zeitabhängig eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen an bioaktivem TNF- α gegenüber den jeweiligen Kontrollen festgestellt werden (*Abbildung 41B+D*).

In der PVN-angereicherten Kultur war dies schon nach 60 min mit Werten von $111,0 \pm 13,6$ pg/ml (LPS) bzw. $157,3 \pm 27,7$ 90 pg/ml (LPS+PyrAp13) gegenüber der Kontrolle mit $27,2 \pm 21,2$ pg/ml gegeben ($p \leq 0,05$ bzw. $\leq 0,01$) (*Abbildung 41B*). Bei eindeutig maximaler Stimulation nach 90 min zeigten jedoch nur die mit LPS stimulierten Zellen mit $615,7 \pm 185,8$ pg/ml gegenüber den Kontrollen mit $20,7 \pm 14,7$ pg/ml eine signifikante Erhöhung des TNF- α Gehalts im Überstand ($p \leq 0,05$). Die mit LPS+PyrAp13 stimulierten PVN-Kulturen hatten hingegen mit $212,25 \pm 81,8$ pg/ml wesentlich niedrigere, gegenüber der Kontrolle nicht signifikant erhöhte, Werte. Nach 120 min konnte sowohl für die mit LPS ($146,5 \pm 17,3$ pg/ml) als auch die mit LPS+PyrAp13 behandelten Zellen ($197,2 \pm 24,2$ pg/ml) eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrolle ($22,5 \pm 16,5$ pg/ml) an TNF- α im Kulturüberstand ermittelt werden ($p \leq 0,001$). Zu keinem Zeitpunkt unterschieden sich jedoch die LPS- und die LPS+PyrAp13-Versuchsgruppen voneinander ($p \leq 0,05$), wenngleich nach 90 minütiger Inkubation mit PyrAp13+LPS eine tendenzielle Reduktion der TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand gegenüber den nur mit LPS behandelten Wells zu verzeichnen war.

Für die MnPO-Kultur zeigten die LPS-stimulierten Zellen mit $130,8 \pm 28,2$ bzw. $108,0 \pm 33,4$ und $443,8 \pm 152,8$ pg/ml gegenüber den Kontrollen eine signifikante Erhöhung der TNF- α Level im Überstand nach 30, 60 und 90 Minuten ($p \leq 0,05$). Im Gegensatz dazu konnte für die Gruppe der kombinierten Behandlung aus LPS+PyrAp13 mit $92,5 \pm 39,1$ bzw. $160,6 \pm 41,1$ und $208 \pm 41,7$ pg/ml gegenüber den Kontrollen zu keinem Zeitpunkt ein signifikant erhöhtes Niveau erreicht werden ($p > 0,05$). Ähnlich wie für die PVN-Kultur geschildert konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in den TNF- α Werten der LPS und LPS+PyrAp13 behandelten Werte ermittelt werden.

Somit war für beide Cytokine und in beiden Kulturen zu keinem in dieser Studie untersuchten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden LPS-Gruppen zu beobachten. Jedoch konnte, wie bereits erwähnt, in beiden Kulturen eine ausgeprägte Tendenz zur Reduktion des bioaktiven TNF- α durch die gleichzeitige Stimulation mit PyrAp13 nach 90 min gezeigt werden (Abbildung 41B+D).

2. Apelinerge Aktivierung von ERK1/2 in der primären Hypophysen-zwischenlappenkultur

Die Phosphorylierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2 nach apelinergen Stimulation und Bindung an das APJ-Rezeptorprotein wurde als einer der vorrangigen, intrazellulären Signaltransduktionswege für Apelin13 in mehreren primären oder transfizierten Zellkultursystemen beschrieben (O'Donnell et al., 2007; Bai et al., 2008; Zeng et al., 2009). Anhand der vorliegenden Studie sollte daher die Phosphorylierung von ERK1/2 im apelinergen Signalweg auch an Zellen der Primärkultur des Hypophysenzwischenlappens (HZL) überprüft werden. Als Vergleichszellen mit nachgewiesener ERK1/2 Phosphorylierung nach Stimulation mit Phenylephrin dienten Kardiomyozyten der Ratte. Die exemplarische Darstellung eines zu diesem Zweck durchgeführten Western Blots ist in Abbildung 42 zu sehen.

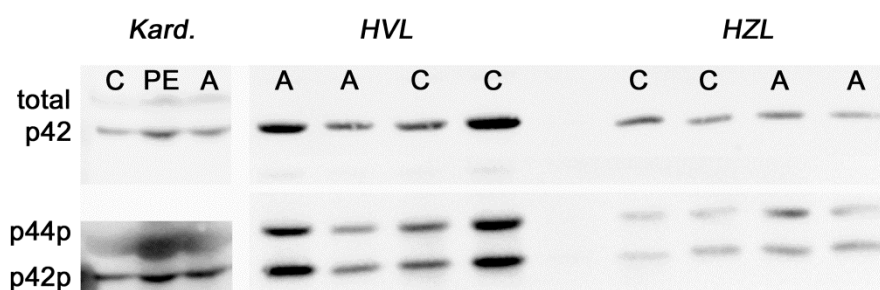


Abbildung 42: Exemplarische Darstellung eines Western Blots zur Untersuchung der Phosphorylierung von p42/p44 (*extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2) nach Stimulation mit PyrAp13 in verschiedenen primär kultivierten Zellen.

Immunologische Detektion von Gesamt-p42 (oben) und entsprechend phosphoryliertem Protein (p44p und p42p, unten) nach 15-minütiger Stimulation mit Phenylephrin (PE), pyroglutamyliertem Apelin13 (A, 10^{-7} mol/l) oder zur Kontrolle ohne Stimulation (C).

Verwendete Zellen: Positivkontrolle Kardiomyozyten (Kard.), Hypophysenvorderlappen- (HVL) und -zwischenlappenkultur (HZL) der Ratte.

Die untersuchten Kardiomyozyten zeigten in der quantitativen Western Blot Analyse nach Stimulation mit PyrAp13 im Vergleich zu den unbehandelten Kardiomyozyten erstaunlicherweise eine tendenzielle Reduktion des Verhältnisses von p42p zu p42. (Abbildung 43) Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit Phenylephrin zu einem Anstieg der Ratio. Beide beobachteten Effekte wiesen jedoch kein signifikantes Niveau auf.

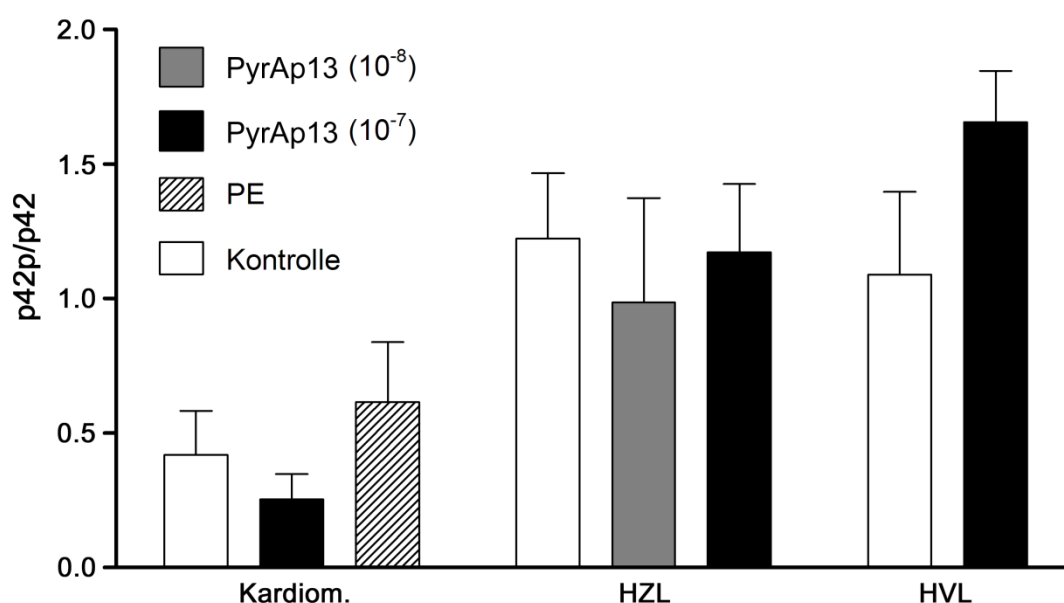


Abbildung 43: Western Blot-Auswertung für das Verhältnis von phosphorylierter Form der extracellular signal-regulated kinase 2 (p42p) zur Gesamtmenge des Enzyms (p42) in Proteinextrakten kultivierter Kardiomyozyten (Kard.), Hypophysenzwischenlappen- (HZL) und -vorderlappenzellen (HVL) nach Stimulation mit PyrAp13.

Kardiomyozyten sowie Zellen des HZLs und HVLs wurden mit pyroglutamyliertem Apelin13 (PyrAp13) bei 37 °C für 15 Minuten mit einer Dosis von 10^{-7} mol/l (schwarze Balken) oder 10^{-8} mol/l (grauer Balken) stimuliert. Als Kontrolle (weiße Balken) diente Medium ohne entsprechenden Zusatz. Die Kardiomyozyten wurden als Positivkontrolle zusätzlich mit 10 μ mol/l Phenylephrin (PE, gestreifter Balken) behandelt. Alle dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. der desitometrischen Auswertungen. Kardiomyozyten: n=4; HZL: n=7-9; HVL n=4-5. Statistische Signifikanzanalyse: Kard.+HZL: One-way ANOVA mit Newman-Keuls post-hoc test; HVL: Mann-Whitney U-test.

In der primären Kultur des HZLs konnte durch die Stimulation mit PyrAp13 gegenüber der Kontrolle keine Änderung des Verhältnisses von phosphoryliertem p42 zum Gesamtprotein

festgestellt werden. Dies betraf sowohl die Stimulation in der Konzentration von 10^{-7} als auch 10^{-8} mol/l. Hingegen zeigte sich in der Primärkultur des HVLs durch die Behandlung mit PyrAp13 gegenüber der entsprechenden Kontrolle ein deutlicher Trend zur Erhöhung der Ratio von p42p zu p42. Dieser war jedoch ebenfalls nicht signifikant. Generell zeigten jedoch alle Proben sowohl des HZLs als auch HVLs eine gegenüber den Positivkontrollen der Kardiomyozyten deutlich erhöhte basale Phosphorylierung der ERK1/2

V. Funktionale *in vivo* Studien

1. Modulierende Wirkung von zentralem PyrAp13 auf LPS-induzierte Komponenten des *sickness behavior*

In diesem Versuch sollte die modulierende Wirkung von intracerebroventrikulär (i.c.v.) mikroappliziertem pyroglutamylierten Apelin13 (PyrAp13) auf die durch intraperitoneal (i.p.) verabreichtes LPS-induzierten Komponenten der zentralnervös vermittelten Akute-Phase-Antwort, namentlich Fieberentwicklung, eingeschränkte Lokomotion und sowie Futter- (Anorexie) und Wasseraufnahme (Adipsie), untersucht werden. Zusätzlich konnte in den Kontrollgruppen ohne LPS-Applikation die Auswirkung von PyrAp13 *per se* auf die telemetrisch aufgezeichneten Parameter überprüft werden. Dazu wurden zwei Behandlungsgruppen (1. LPS i.p. + PyrAp13 i.c.v. und 2. PBS i.p. + PyrAp13 i.c.v.) und zwei entsprechende Kontrollgruppen (3. LPS i.p. + aCSF i.c.v. und 4. PBS i.p. + aCSF i.c.v.) gebildet.

Die Körperkerntemperaturen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen drei Stunden vor der i.c.v. Mikroinjektion lagen im Mittel bei $37,40 \pm 0,45$ °C (LPS + PyrAp13); $37,46 \pm 0,64$ °C (LPS + aCSF); $37,79 \pm 0,46$ °C (PBS + PyrAp13) und $37,35 \pm 0,44$ °C (PBS + aCSF). Zwischen einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$)

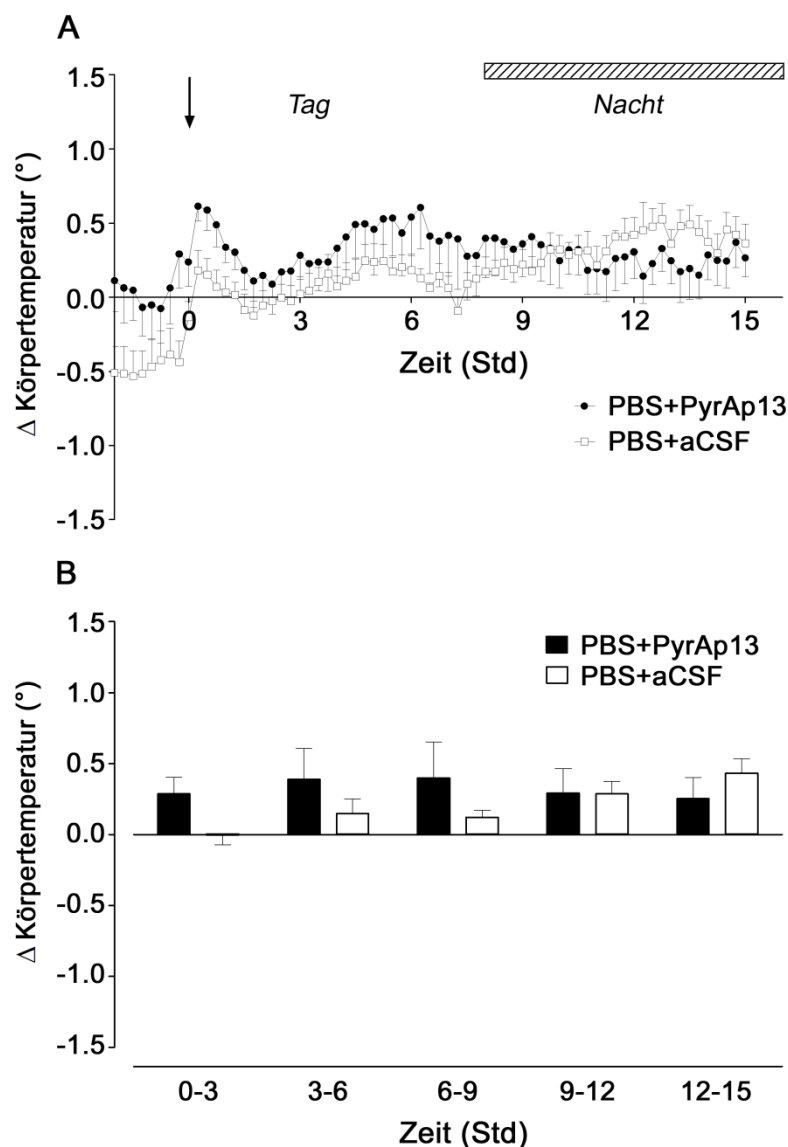


Abbildung 44: Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur als ΔT_b -Werte nach intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Injektion von pyroglutamyltem Apelin13 (PyrAp13) oder artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) bei der Ratte.

Die Abweichung der Körperkerntemperatur post injectionem wurde relativ zum 24 Stunden-Mittelwert drei Tage vor der Injektion jedes Tieres als ΔT_b -Wert ermittelt. (A) Zeitverlauf der ΔT_b -Werte in Tieren mit intraperitonealer (i.p.) PBS-Injektion und entweder i.c.v. PyrAp13 (20 nmol) (schwarze Kreise; $n=7$) oder aCSF (weiße Quadrate; $n=8$) Mikroinjektionen. Der Pfeil in A zeigt den Zeitpunkt der Applikation, der gestreifte Balken die Nacht-Phase ab 19:00 Uhr. (B) Mittlere Veränderung der Körpertemperatur in 3-Std.-Intervallen nach i.c.v. PyrAp13 (schwarze Balken) oder aCSF (weiße Balken). Statistische Signifikanzanalyse: Two-way ANOVA (repeated measures) mit Newman-Keuls post-hoc test. $P > 0,05$. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt.

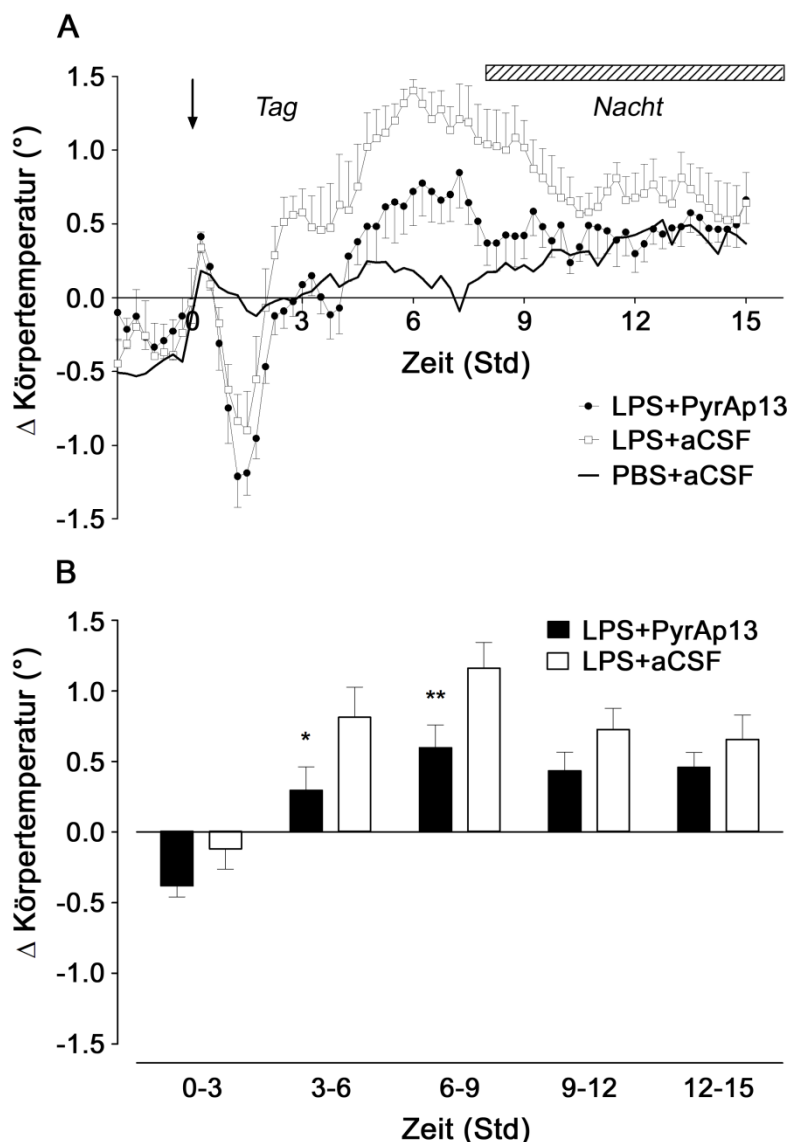


Abbildung 45: Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperatur als ΔT_b -Werte nach Lipopolysaccharid (LPS)-induziertem Fieber und intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Injektion von pyroglutamyliertem Apelin13 (PyrAp13) oder artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) bei der Ratte.

Die Abweichung der Körperkerntemperatur post injectionem wurde relativ zum 24 Stunden-Mittelwert drei Tage vor der Injektion jedes Tieres als ΔT_b -Wert ermittelt. (A) Zeitverlauf der ΔT_b -Werte in Tieren mit i.c.v. PyrAp13 (20 nmol) (schwarze Kreise, $n=6$) und aCSF (weiße Quadrate; $n=7$) Applikation auf durch simultane intraperitoneale (i.p.) Injektion von LPS (100 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht) ausgelöstes Fieber. Die Kontrollgruppe (i.p. PBS + i.c.v. aCSF) ist durch eine durchgezogene Linie dargestellt. Der Pfeil in A zeigt den Zeitpunkt der Injektion, der gestreifte Balken die Nacht-Phase ab 19:00 Uhr. (B) Mittlere Veränderung der Körperkerntemperatur in 3-Std.-Intervallen nach i.c.v. PyrAp13 (schwarze Balken) oder aCSF (weiße Balken). Statistische Signifikanzanalyse: Two-way ANOVA (repeated measures) mit Newman-Keuls post-hoc test. $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ für LPS+PyrAp13 vs. LPS+aCSF. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M. dargestellt.

1.1 Wirkung von i.c.v. mikroappliziertem PyrAp13 auf die Körperkern- temperatur unter Basalbedingungen sowie LPS-induziertem Fieber

Die Veränderung der Körperkerntemperaturwerte (ΔT_b) zwischen den Kontrollgruppen (i.c.v. PyrAp13 vs. aCSF), welchen statt LPS (100 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht) zur Kontrolle PBS i.p. verabreicht wurde, unterschieden sich statistisch nicht signifikant voneinander (*Abbildung 44*) während aller Zeitintervalle. Im Zeitraum von ein bis zwei Std. nach den erfolgten Injektionen zeigten die Tiere der beiden Versuchsgruppen ein kurzfristiges, stressbedingtes Ansteigen der Körpertemperatur um 0,2-0,7 °C bedingt durch die mit den Injektionen einhergehenden Stressbelastungen. In den mit PyrAp13-behandelten Ratten war dieser Effekt nicht signifikant, jedoch tendenziell stärker ausgeprägt (*Abbildung 44B*).

Prinzipiell zeigten in den ersten drei 3Std.-Intervallen nach den Injektionen die mit PyrAp13-behandelten Tiere eine Tendenz zu einer gegenüber den Kontrollen erhöhten Temperatur (*Abbildung 44B*). Im Gegensatz dazu erschienen bei der Betrachtung des Zeitraums 11-14 Stunden nach der Injektion die Körpertemperaturen der PBS+aCSF-Gruppe gegenüber der mit PyrAp13 i.c.v. behandelten Gruppe leicht erhöht. Keine der zwischen den i.c.v. PyrAp13 und aCSF mikroapplizierten Tiergruppen aufgeführten Tendenzen und Unterschiede erwiesen sich jedoch als signifikant.

In beiden systemisch mit LPS (100 $\mu\text{g/kg}$ KG) behandelten Gruppen, bei i.c.v. Mikroapplikation von aCSF oder PyrAp13 (20 nmol), kam es direkt nach der Injektion ebenfalls zu einem stressbedingten, kurzen Anstieg der Körperkerntemperatur um $0,41 \pm 0,11$ °C (LPS+PyrAp13) bzw. $0,34 \pm 0,10$ °C (LPS+aCSF) (*Abbildung 45A*). Der Effekt war jedoch bei diesen Tieren zeitlich wesentlich kürzer ausgeprägt als bei den Versuchsgruppen ohne LPS-Applikation der *Abbildung 44*, da anschließend, ebenfalls in beiden Gruppen, eine transient ausgeprägte, LPS-bedingte Hypothermie zu verzeichnen war. Bei der Gruppe mit PyrAp13-Mikroinjektion wurden dabei minimal niedrigere Werte ($-1,21 \pm 0,21$ °C) als bei den mit aCSF-applizierten Tieren ($-0,83 \pm 0,18$ °C) ermittelt. Auch dieser Vergleich erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Direkt im Anschluss an die Hypothermie kam es in der LPS+aCSF-Gruppe zur Ausbildung eines typischen biphasischen Fiebers. Dieses hatte seinen ersten Peak ($+0,58 \pm 0,16$ °C) drei Std. nach der Injektion. Das Maximum der zweiten Phase ($+1,40 \pm 0,07$ °C) trat entsprechend sechs Std. nach der i.p.-Applikation auf.

LPS-behandelte Tiere, welche gleichzeitig i.c.v. PyrAp13 erhielten, zeigten eine nahezu vollständige Suppression der ersten Fieberphase und danach ein signifikant reduziertes Fieber (*Abbildung 45A*). Dies geschah zum einen im Zeitraum von 3-6 Std. nach den Injektionen, in dem die mit PyrAp13 mikroapplizierte Gruppe ($+0,30 \pm 0,17$ °C) verglichen mit der entsprechenden Kontrolle (aCSF i.c.v.) ($+0,81 \pm 0,22$ °C) eine signifikante Reduktion der LPS-induzierten Fieberreaktion aufwies ($p \leq 0,05$). Dieser Effekt trat im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,16 \pm 0,18$ °C) mit noch stärkerer Ausprägung 6-9 Stunden *post injectionem* auf ($0,60 \pm 0,16$ °C; $p \leq 0,01$) (*Abbildung 45B*). Zu den darauffolgenden Zeitintervallen konnte keine signifikante Reduktion der Körperkerntemperatur bei den Tieren mit zentraler PyrAp13-Mikroapplikation gegenüber den Kontrollen mit zentraler aCSF-Mikroapplikation mehr ermittelt werden, obwohl die mit PyrAp13 behandelte Gruppe auch hier eine Tendenz zu einer niedrigeren Körpertemperatur zeigte.

1.2 Wirkung von i.c.v. mikroappliziertem PyrAp13 auf die allgemeine lokomotorische Aktivität

Die mit i.c.v. PyrAp13 behandelten Tiere der Gruppe ohne systemische LPS-Injektion zeigten, verglichen mit ihrer Kontrollgruppe (i.c.v. aCSF; $-9,17 \pm 2,65$ %) eine signifikant erhöhte basale lokomotorische Aktivität ($+7,81 \pm 7,51$ %) in den 24 Std. *post injectionem* ($p \leq 0,05$) (*Abbildung 46*). Beide mit LPS (i.p.) injizierten Gruppen zeigten mit $-60,16 \pm 5,18$ % (LPS+PyrAp13) bzw. $-60,02 \pm 4,48$ % (LPS+aCSF) eine gleich stark ausgeprägte Reduktion der lokomotorischen Aktivität. Diese war jeweils gegenüber beiden mit PBS i.p. behandelten Versuchstiergruppen hoch signifikant erniedrigt ($p \leq 0,001$).

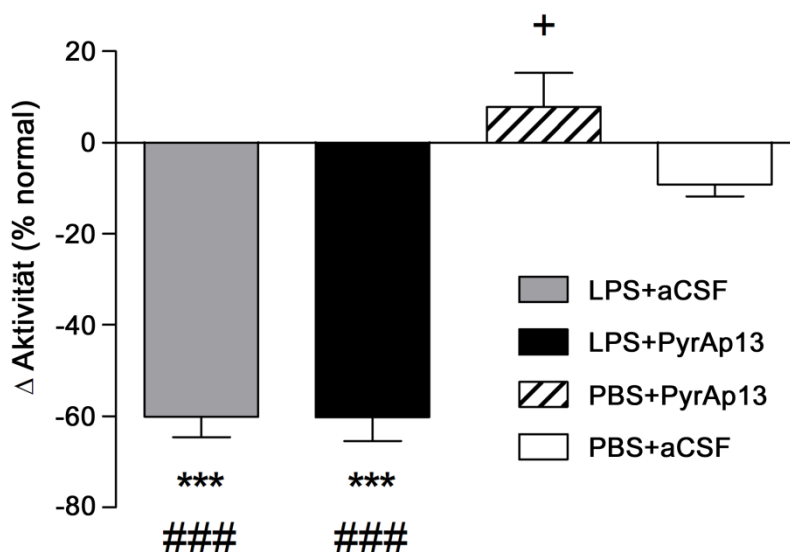


Abbildung 46: Modulatorischer Einfluss von i.c.v. mikroappliziertem PyrAp13 auf die lokomotorische kumulative 24 Std. Aktivität: Einfluss der LPS-Behandlung bei der Ratte.

Kumulative lokomotorische Gesamtaktivität über 24 Std. nach intraperitonealer (i.p.) Injektion von 100 µg/kg LPS (n=5) bzw. PBS (n=6) und i.c.v. Mikroapplikation von PyrAp13 (schwarze bzw. gestreifte Balken) oder artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) (graue bzw. weiße Balken). Alle Daten sind als Mittelwerte ± S.E.M. in Prozent der Normalaktivität aus vergleichbaren Zeiträumen vor den Injektionen dargestellt. Statistische Signifikanzanalyse: One-way ANOVA mit Newman-Keuls post-hoc test. *** $p \leq 0,001$ LPS+aCSF bzw. LPS+PyrAp13 versus PBS+PyrAp13 oder #### LPS+aCSF bzw. LPS+PyrAp13 zu PBS+aCSF, + $p \leq 0,05$ PBS+PyrAp13 gegenüber PBS+aCSF.

1.3 Wirkung von i.c.v. PyrAp13 auf die Futter-/Wasseraufnahme und die LPS-induzierte Anorexie/Adipsie

Sowohl zwischen den beiden mit LPS-behandelten Versuchstiergruppen als auch den beiden Gruppen mit i.p. PBS Behandlung ergaben sich für die 6, 12 und 24 Std. berechneten kumulativen Werte der Aufnahme von Trinkwasser bzw. pulverisierter Nahrung, in prozentualen Werten im Vergleich zu vergleichbaren Zeiträumen vor der i.c.v./i.p. Injektion keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 47). Die LPS-Injektion verursachte in beiden Behandlungsgruppen im analysierten Zeitraum typische Anzeichen eines *sickness behavior* mit markant reduzierter Futter- und Wasseraufnahme.

Obwohl in der LPS+aCSF-Gruppe die kumulative Futteraufnahme in der Zeitspanne bis sechs Std. nach der Injektion um ca. 50 % reduziert war, zeigte hier nur die LPS+PyrAp13 Gruppe

eine signifikante Absenkung ($-89,3 \pm 10,1 \%$; $p \leq 0.05$). Dies galt jedoch nur gegenüber der Kontrollgruppe (PBS i.p.) mit PyrAp13-Injektion (*Abbildung 47A*). Im Gegensatz dazu konnte in den Daten der totalen Delta Futteraufnahme von 12 bzw. 24 Std. nach den i.p./i.c.v. Injektionen für beide LPS-Gruppen eine signifikante Abnahme der Futteraufnahme im Vergleich zu jeweiligen Kontrollgruppen festgestellt werden ($p \leq 0,001$, *Abbildung 47B+C*). Zwischen den i.p. mit LPS-behandelten Tierversuchsgruppen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied durch die zentrale PyrAp13-Mikroapplikation. Apelin vermochte es somit nicht, die LPS-induzierte Anorexie zu modulieren.

Die kumulative Wasseraufnahme über 12 bzw. 24 Std. nach den Injektionen wurde durch die LPS-Behandlung i.p. in beiden Behandlungsgruppen gegenüber den beiden Kontrollgruppen ebenfalls markant reduziert ($p \leq 0,001$; *Abbildung 47D+E*). Auch bei diesem Parameter gab es jedoch, wie schon für die Nahrungsaufnahme geschildert, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Grafik der kumulativen 12 Std.-Wasseraufnahme zeigt eine Tendenz zu einer leicht reduzierten Wasseraufnahme der mit PyrAp13 i.c.v. injizierten Versuchstieren gegenüber den mit aCSF i.c.v. behandelten Ratten (*Abbildung 47D*). Diese Wirkung war jedoch nicht statistisch signifikant ausgeprägt.

Sowohl bei der Futter- als auch der Wasseraufnahme ergab sich bei den 24-Stunden-Daten durch die i.c.v. Verabreichung von PyrAp13 einen Trend zu einer Abschwächung der LPS-induzierten Anorexie und Adipsie (*Abbildung 47C+E*). Dieser Effekt war jedoch ebenfalls nicht signifikant ausgeprägt.

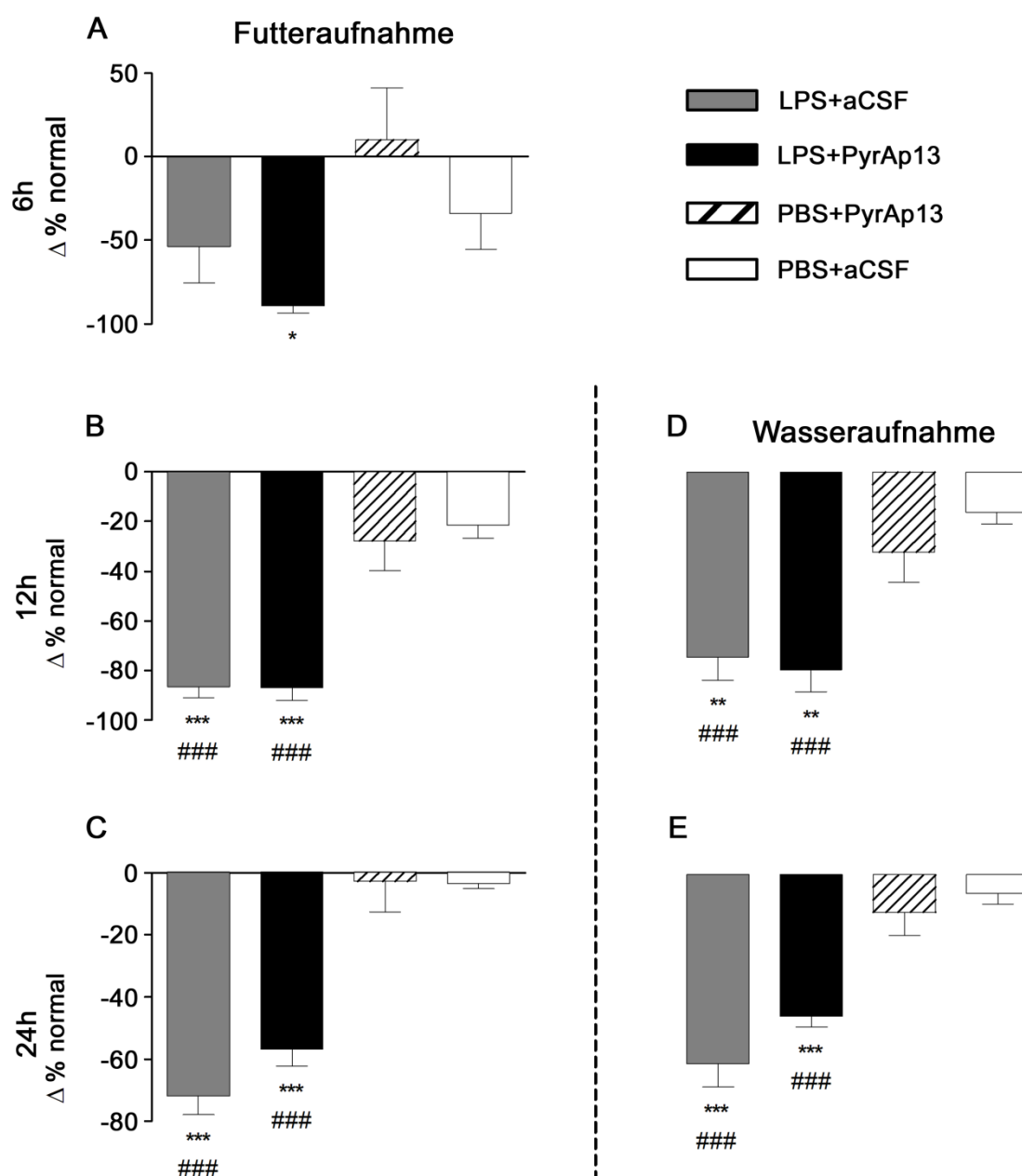


Abbildung 47: Modulatorischer Einfluss von intracerebroventrikulär (i.c.v.) mikro-appliziertem PyrAp13 auf die kumulative Futter- und Wasseraufnahme: Einfluss der Lipopolysaccharid (LPS)-Behandlung bei der Ratte.

Kumulative Futteraufnahme bzw. Wasseraufnahme über (A) 6h, (B+D) 12 Std. und (C+E) 24 Std. nach der simultanen Injektion von i.c.v. PyrAp13 (schwarze Balken bzw. gestreifte Balken, $n=5-7$) oder artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) (graue bzw. weiße Balken $n=5-7$) und intraperitonealem (i.p.) LPS (100 $\mu\text{g/kg KG}$) bzw. PBS. Alle Daten sind als Mittelwerte der prozentualen normalen Aufnahme \pm S.E.M. jedes Tieres zu vergleichbaren Zeiträumen vor den Injektionen dargestellt. Statistische Signifikanzanalyse: One-way ANOVA mit Newman-Keuls post-hoc test. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ LPS+aCSF bzw. LPS+PyrAp13 versus PBS+PyrAp13 oder #-### LPS+aCSF bzw. LPS+PyrAp13 im Vergleich zu PBS+aCSF.

1.4 Wirkung von i.c.v. mikroappliziertem PyrAp13 auf die Freisetzung proinflammatorischer Cytokine

Die systemische (i.p.) Injektion von LPS (100 µg/kg KG) führte bei den Versuchstieren zu einem ausgeprägten Anstieg an biologisch aktivem TNF-α im Plasma ($22,5 \pm 3,5$ ng/ml). Die gleichzeitige Behandlung mit i.c.v. mikroappliziertem PyrAp13 resultierte in einer signifikanten Reduktion des LPS-induzierten Anstiegs auf Werte von $14,8 \pm 1,9$ ng/ml; $p \leq 0,05$ (Abbildung 48A). Im Gegensatz dazu war in beiden Versuchsgruppen mit systemischer (i.p.) PBS Injektion kein biologisch aktives TNF-α nachweisbar, bzw. lagen die Werte unterhalb des Detektionslimits von 6pg/ml für diesen Assay.

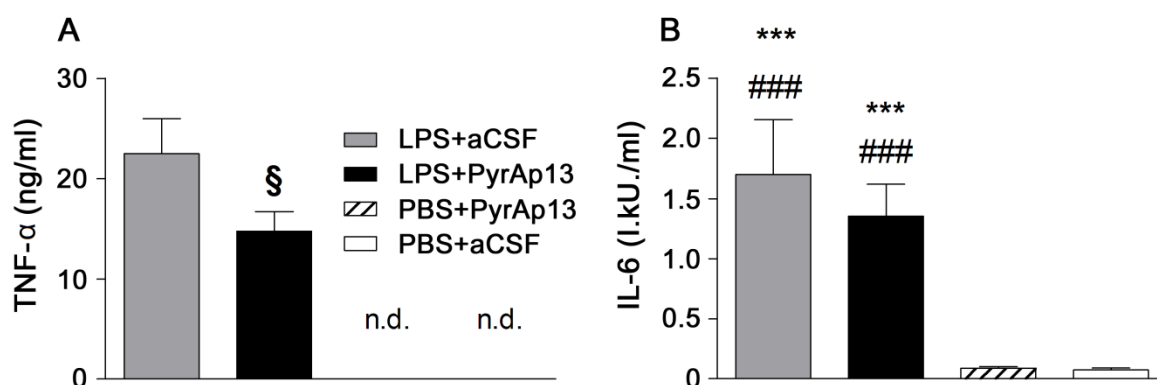


Abbildung 48: Modulatorischer Einfluss von intracerebroventrikulärer (i.c.v.) mikroappliziertem PyrAp13 auf den Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Anstieg der Serumlevel bioaktiver Cytokine: Einfluss der Lipopolysaccharid (LPS)-Behandlung bei der Ratte.

Die Serumlevel von bioaktivem (A) TNF-α und (B) IL-6 wurden 2 Std. nach simultaner Injektion von i.c.v. PyrAp13 (schwarze Balken bzw. gestreifte Balken, $n=6$) bzw. artifiziereller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) (graue bzw. weiße Balken $n=5-6$) und intraperitonealem (i.p.) LPS (100 µg/kg KG) bzw. PBS ermittelt. Das Detektionslimit der Assays lag bei 6 pg/ml für TNF-α und 3 I.U./ml für IL-6. Die Werte der Kontrollgruppen waren nicht detektierbar (n.d.) für TNF-α. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. Statistische Signifikanzanalyse: One-way ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls post-hoc test. *** $p \leq 0,001$ LPS+aCSF bzw. LPS+PyrAp13 versus PBS+PyrAp13 oder ### $p \leq 0,001$ LPS+aCSF bzw. LPS+PyrAp13 im Vergleich zu PBS+aCSF, § $p \leq 0,05$ LPS+PyrAp13 gegen LPS+aCSF.

Die Plasmalevel an bioaktivem IL-6 in beiden mit LPS behandelten Gruppen waren mit $1,70 \pm 0,46$ I.kU./ml (LPS+aCSF) bzw. $1,35 \pm 0,26$ I.kU./ml (LPS+PyrAp13) ebenfalls stark erhöht und unterschieden sich gegenüber $0,07 \pm 0,01$ I.kU./ml (PBS+aCSF) bzw. $0,09 \pm 0,01$ I.kU./ml (PBS+PyrAp13) signifikant von den beiden i.p. mit PBS behandelten

Versuchstiergruppen ($p \leq 0,001$; *Abbildung 48B*) Die gleichzeitige Behandlung mit i.c.v. mikroappliziertem PyrAp13 führte bei diesem Cytokin sowohl bei der systemischen Applikation von LPS als auch PBS zu keiner signifikanten Änderungen des Plasmaspiegels ($p > 0,05$). Im Vergleich zu den jeweils mit aCSF i.c.v. behandelten Gruppen.

2. Modulierende Wirkung von zentralem i.c.v. PyrAp13 auf AngII-induziertes Trinkverhalten und Induktion von c-Fos

AngII als bioaktives Endprodukt des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) stellt das bedeutendste Peptid für die Stimulation des zentral vermittelten Trinkverhaltens dar (McKinley et al., 2003; Antunes-Rodrigues et al., 2004). Dabei repräsentieren der MnPO und der PVN die wichtigsten Zielstrukturen für hypothalamisch gebildetes AngII, und aktivierte Neurone beider Strukturen zeigen AngII-induziert in den Zellkern transloziertes Fos-Protein als wichtigen Transkriptionsfaktor (Sharp et al., 1991; Oldfield et al., 1994). Kagiya et al., (2005) deuteten an, dass nach einer i.c.v. Mikroinjektion von PyrAp13 (20 nmol) die Expression und Translokation von c-Fos in einigen Neuronen des PVN von Ratten ebenfalls induziert wurde. Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb zum einen, neben dem PVN weitere hypothalamische Nuclei auf ihre c-Fos Expression nach i.c.v. Applikation von PyrAp13 zu untersuchen. Darüber hinaus sollte eine mögliche inhibitorische Wirkung der PyrAp13 Injektion auf das AngII-induzierte Trinkverhalten und die dadurch induzierte nukleäre c-Fos Translokation studiert werden.

2.1 Trinkverhalten

In *Abbildung 49B und C* ist die Trinkwasseraufnahme 30 und 90 min nach den i.c.v. Injektionen für alle vier Versuchstiergruppen dieses Versuches dargestellt. Die beiden Gruppen ohne zentrale AngII-Applikation unterschieden sich zu keinem der beiden Zeitpunkte signifikant voneinander ($p > 0,05$), obwohl eine leichte Tendenz zu erhöhter Wasseraufnahme sowohl nach 30 min mit $0,36 \pm 0,22$ ml (aCSF) bzw. $0,88 \pm 0,41$ ml (PyrAp13) als auch nach 90 min mit $0,92 \pm 0,56$ ml (aCSF) bzw. $1,6 \pm 0,30$ ml (PyrAp13) durch die Mikroapplikation von PyrAp13 *versus* aCSF bestand.

Durch die i.c.v. Applikation von AngII (40 pmol) kam es zu einer markanten Induktion des Trinkverhaltens der Tiere (*Abbildung 49A*). Der zeitliche Verlauf der Trinkwasseraufnahme zeigte dabei eine klassische Sättigungskinetik, wobei nach etwa 20 min die Trinkkurve nahezu parallel zur X-Achse verlief. Nach Ablauf dieses Zeitpunktes wurde somit nur noch sehr wenig Wasser aufgenommen.

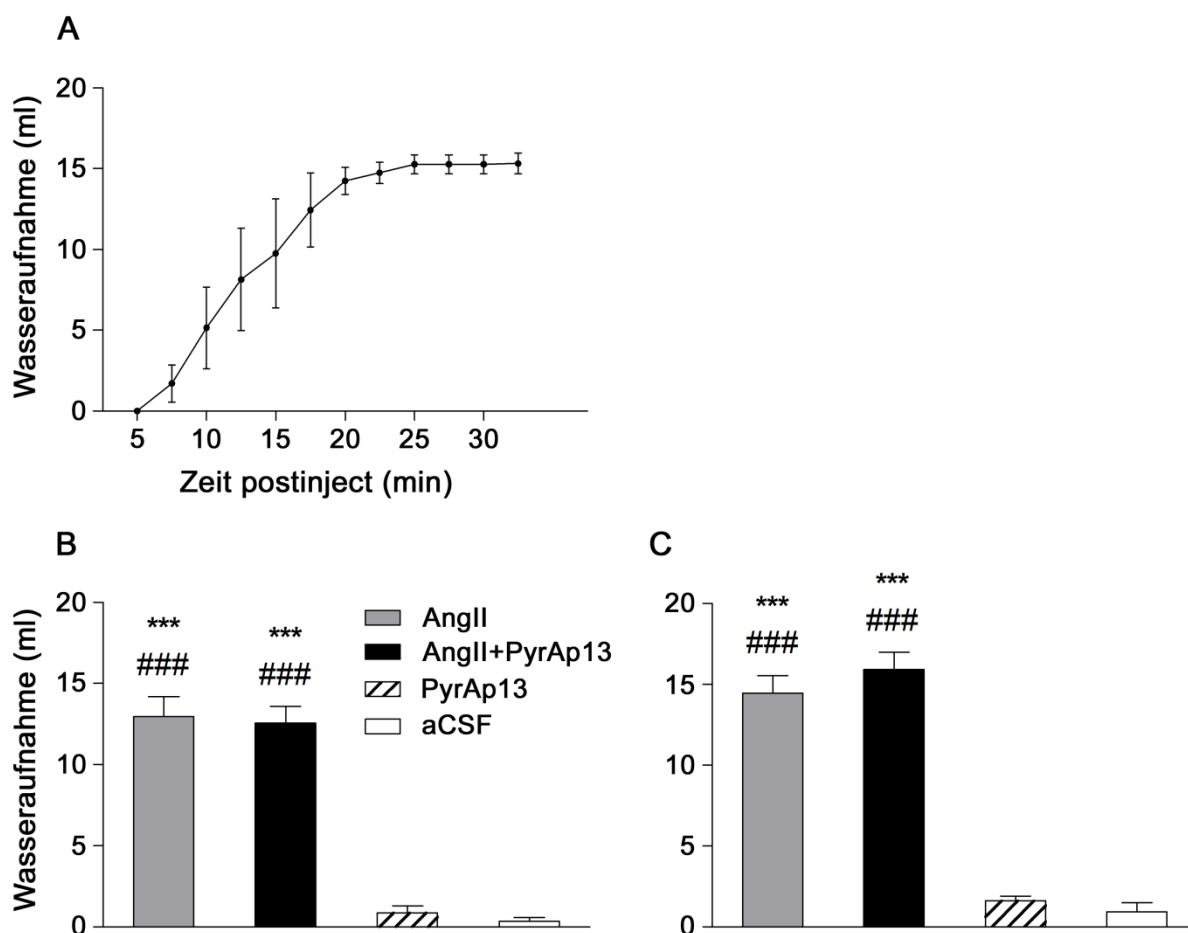


Abbildung 49: Trinkwasseraufnahme nach intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Mikroapplikation von PyrAp13, AngII sowie AngII+PyrAp13 bei der Ratte.

(A) Zeitlicher Verlauf der Trinkwasseraufnahme in ml nach i.c.v. Injektion von Angiotensin II (40 pmol). Kumulative Wasseraufnahme (B) 30 und (C) 90 min nach i.c.v. Mikroapplikation von Angiotensin II (grauer Balken), PyrAp13 (20 nmol)+AngII (40 pmol, schwarzer Balken), PyrAp13 (20 nmol, gestreifter Balken) und artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF, weißer Balken). Dargestellt sind Mittelwerte + SEM; A: $n=5$, B: $n=4-5$. Statistische Signifikanzanalyse: One-way ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls post-hoc test. *** $p \leq 0,001$ versus PyrAp13 oder #### $p \leq 0,001$ im Vergleich zu aCSF.

Beide Gruppen mit zentraler AngII-Mikroapplikation zeigten sowohl nach 30 min (*Abbildung 49B*) mit $12,56 \pm 1,35$ ml (AngII) bzw. $12,96 \pm 1,35$ ml (AngII+PyrAp13) als auch 90 min nach der Injektion (*Abbildung 49C*) mit $14,45 \pm 1,09$ ml (AngII) bzw. $15,93 \pm 1,07$ ml

(AngII+PyrAp13) eine gegenüber den Gruppen mit aCSF- und PyrAp13-Injektion signifikant erhöhte Trinkwasseraufnahme ($p \leq 0,001$). Signifikante Unterschiede in der Trinkwasseraufnahme beider AngII-Versuchsgruppen konnten zu keinem der beiden Zeitpunkte ermittelt werden, jedoch zeigten die Tiere mit einer kombinierten i.c.v. Injektion von PyrAp13 und AngII nach 90 min eine leicht erhöhte Wasseraufnahme verglichen mit der nur mit AngII-behandelten Gruppe. Die durch AngII hervorgerufene Trinkantwort (ca. 14,5 ml) bedeutet, dass die Ratten innerhalb von 20 min etwa 5-7 % ihres Körpergewichts an Wasser zu sich genommen haben. PyrAp13 vermochte es weder unter Ruhebedingungen noch bei maximaler Stimulation durch AngII, das Trinkverhalten der Tiere zu beeinflussen.

2.2 Expression und Translokation des Transkriptionsfaktors c-Fos

Um eine mögliche modulierende Wirkung von PyrAp13 auf die AngII-induzierte Aktivierung des *immediate early gene* c-fos zu untersuchen, wurde die Expression des c-Fos Proteins und vor allem dessen nukleäre Translokation in verschiedenen hypothalamischen Gehirnstrukturen untersucht. Dazu zählten der PVN, unterteilt in seine periventrikulären, parvozellulären und magnozellulären Substrukturen, der MnPO, SON und SCN. Weiterhin wurde in allen untersuchten Nuclei überprüft, ob die aktivierten Zellen zusätzlich eine Co-Lokalisation mit der neuronalen NO-Synthase (nNOS) aufwiesen. Für den SCN konnte eine cytoplasmatische nNOS-Markierung nicht nachgewiesen werden. Beide Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz detektiert und eine anschließende Quantifizierung der c-Fos (im Zellkern) und nNOS (im Cytoplasma) immunreaktiver Zellen in den genannten Kerngebieten durchgeführt.

Vergleichende Aufnahmen der Immunfluoreszenzsignale für c-Fos und nNOS für die einzelnen Versuchsgruppen zeigten eine markante Zunahme der Immunreaktivität für c-Fos nach i.c.v. Applikation von AngII alleine sowie in Kombination mit PyrAp13. Dies konnte sowohl für den MnPO (*Abbildung 50*) als auch für den PVN (*Abbildung 51*) nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu konnten bei der Kontroll- und PyrAp13-Gruppe hingegen nur wenige c-Fos-immunpositive Zellkerne registriert werden. Die Quantifizierung der ausgewerteten Schnitte für den MnPO und die periventrikuläre und magnozelluläre Komponente des PVN zeigte eine, durch die i.c.v. Injektion von AngII in beiden Behandlungsgruppen induzierte, gegenüber der Kontrollgruppe mit i.c.v. aCSF signifikant

erhöhte Expression des c-Fos Proteins und Translokation in den Zellkern (siehe Abbildung 52A, C, D). Im periventrikulären PVN (Abbildung 52A) zeigten beide mit i.c.v. AngII behandelten Gruppen mit $74,4 \pm 22,2$ (AngII) bzw. $65,0 \pm 11,7$ (AngII+PyrAp13) eine gegenüber der Kontrolle mit $15,2 \pm 1,9$ (aCSF) und den PyrAp13-applizierten Tieren mit $12,1 \pm 2,0$ eine signifikant erhöhte Anzahl an c-Fos-positiven Zellkernen ($p \leq 0,01$ bzw. $\leq 0,05$). Sowohl beide AngII-applizierten Gruppen als auch die PyrAp13- und aCSF-behandelten Versuchstiere unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

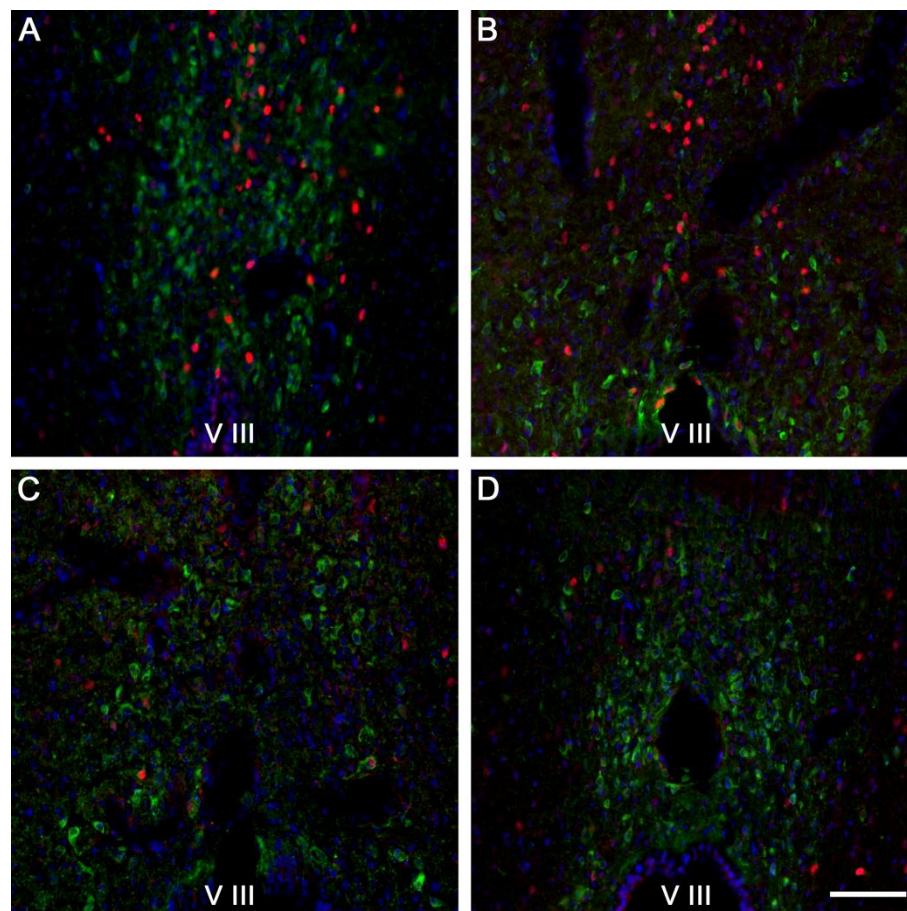
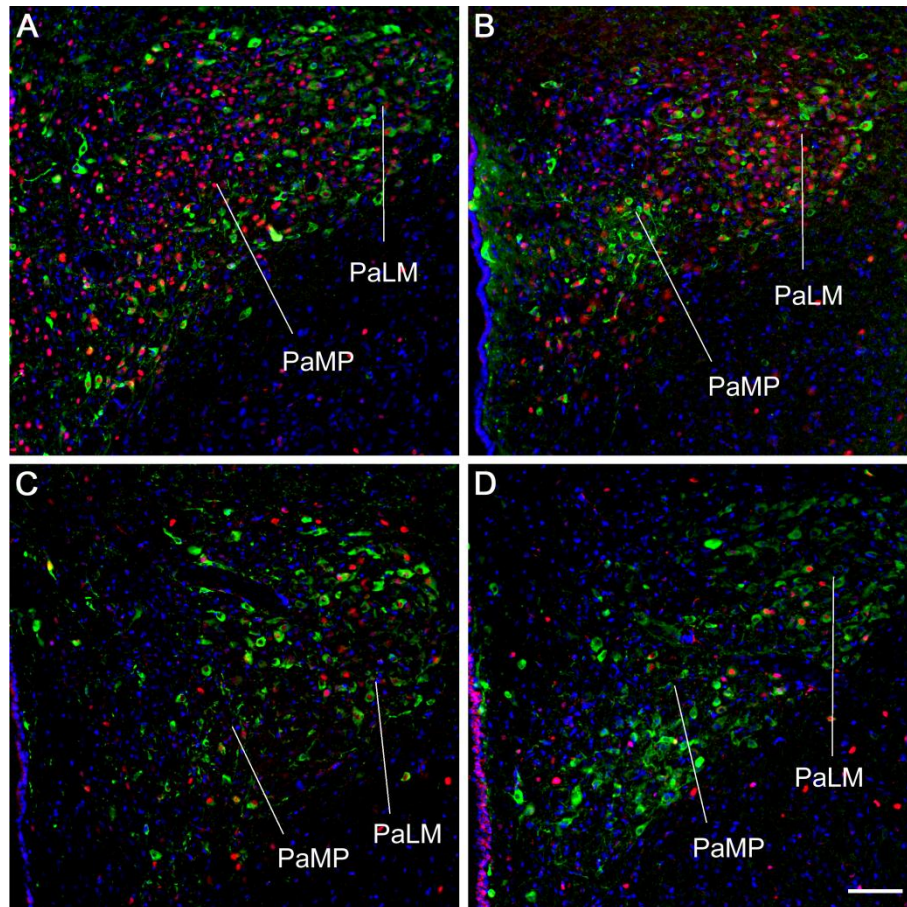


Abbildung 50: Immunfluoreszenzmarkierungen für c-Fos und neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) an Gehirngewebeschnitten der Ratte im Bereich des anterioren MnPO nach intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Applikation von AngII und PyrAp13.

Nachweis der Expression von nNOS und Expression/Translokation von c-Fos durch Markierung mit rabbit anti-Fos bzw. mouse anti-nNOS als Primärantikörper und Alexa488-gekoppeltem (**grün**) donkey anti-mouse IgG bzw. Biotin anti-rabbit IgG als Sekundärantikörper und Cy3-gekoppeltem Streptavidin (**rot**). Markierung aller Zellkerne mit DAPI (**blau**). Die Tiere wurden entweder mit (A) AngII (40 pmol), (B) AngII (40 pmol) + PyrAp13 (20 nmol), (C) PyrAp13 oder (D) artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) i.c.v. mikroappliziert und nach 90 min transkardial perfundiert und die seriell coronalen Gewebeschnitte (Schnittdicke 20 µm) immunfluoreszenzmarkiert. V III = 3. Ventrikel. Größenmarker: 50 µm



In der parvozellulären Substruktur des PVN ergab sich ebenfalls eine, in beiden AngII-Behandlungsgruppen mit $81,7 \pm 30,5$ (AngII) und $73,8 \pm 16,8$ (AngII+PyrAp13) stark erhöhte Zahl an c-Fos positiven Zellen (*Abbildung 52B*). Aufgrund hoher Schwankungen innerhalb der Auswertungen dieses Bereichs ergab sich jedoch keine signifikante Ausprägung. Die Versuchstiere mit zentraler PyrAp13 Behandlung ($18,3 \pm 4,7$) und die Kontrolltiere mit aCSF-Applikation ($15,8 \pm 2,3$) unterschieden sich auch im parvozellulären PVN nicht signifikant. In Bezug auf den nNOS-positiven Anteil konnte eine Signifikanz der Unterschiede beider Angiotensin II-Gruppen mit $19,2 \pm 6,2$ (AngII) bzw. $19,3 \pm 2,6$ gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden ($p \leq 0,05$). Zwischen den AngII-Gruppen und zwischen den mit PyrAp13 bzw. aCSF microapplizierten Tieren traten jedoch erneut keine signifikanten Unterschiede auf. Der Anteil der für nNOS und c-Fos doppelt markierten Zellen lag in den AngII-Gruppen in diesem Teil des PVN mit 23-26 % etwas oberhalb der Werte des periventrikulären Bereichs.

Die Zellen der magnozellulären Substruktur des PVN zeigten erneut für beide AngII-behandelten Gruppen mit $71,6 \pm 23,2$ (AngII) bzw. $72,1 \pm 14,8$ (AngII+PyrAp13) eine deutliche, verglichen mit der Kontrolle und den mit PyrAp13 stimulierten Tieren signifikante Erhöhung der c-Fos-positiven Zellzahlen ($p \leq 0,05$) ohne sich untereinander zu unterscheiden ($p < 0,05$) (*Abbildung 52C*). Die Zellzahl der gleichzeitig c-Fos- und nNOS-positiven Zellen war in beiden AngII-Gruppen mit $25,5 \pm 7,9$ (AngII) bzw. $30,7 \pm 5,0$ (AngII+PyrAp13) ebenfalls signifikant gegenüber derjenigen bei der aCSF-Kontrolle ($4,3 \pm 1,1$) erhöht ($p \leq 0,05$ bzw. $\leq 0,01$). Auch für den magnozellulären PaLM konnten erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen den AngII-Behandlungsgruppen beobachtet werden. Zwischen der aCSF- und PyrAp13-Versuchsgruppe ergab sich jedoch durch die Behandlung mit PyrAp13 eine Tendenz zu gegenüber der aCSF-Kontrolle leicht erhöhten Werten. Dies konnte sowohl für die Gesamtzahl an c-Fos-positiven Zellen (PyrAp13: $16,2 \pm 6,2$ versus aCSF: $8,0 \pm 2,0$) als auch für die mit nNOS Co-Lokalisierten (PyrAp13: $9,5 \pm 4,3$ versus aCSF: $4,3 \pm 1,2$) festgestellt werden. Dieser Trend war jedoch nicht signifikant ausgeprägt. Im magnozellulären Teil des PVN konnte in den Behandlungsgruppen mit 35-42 % der höchste Anteil der c-Fos-positiven nNOS-Neurone im PVN beobachtet werden.

Die Injektion von AngII bewirkte im MnPO (*Abbildung 52D*) ebenfalls in beiden AngII-Behandlungsgruppen mit $121,9 \pm 28,9$ (AngII) bzw. $147,8 \pm 22,6$ (AngII+PyrAp13) einen gegenüber der Kontrolle (aCSF i.c.v.) mit $50,2 \pm 12,0$ ausgeprägten Anstieg der Anzahl an c-Fos-positiven Zellen (AngII+PyrAp13: $p \leq 0,01$; AngII: $p \leq 0,05$). Im direkten Vergleich

sowohl der beiden AngII-Versuchsgruppen als auch zwischen den mit PyrAp13 oder aCSF behandelten Tieren konnte erneut kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Auch die nNOS-positiven Neurone mit c-Fos-IR zeigten sich mit $40,6 \pm 7,2$ (AngII) bzw. $46,7 \pm 9,8$ (AngII+PyrAp13) gegenüber der mit aCSF i.c.v.-injizierten Kontrollgruppe ($11,3 \pm 5,6$) deutlich und signifikant erhöht ($p \leq 0,01$). Innerhalb der AngII-Behandlungsgruppen und den nicht mit AngII-applizierten Tieren ergaben sich sowohl für die c-Fos-positiven Zellen alleine, als auch die mit nNOS Co-Lokalisierten erneut keine signifikanten Unterschiede. Im MnPO lag in den AngII-Gruppen der Anteil an Zellen mit nNOS und c-Fos Co-Lokalisation bei 31-32 % aller aktivierten Zellen.

Im Gegensatz dazu war in den untersuchten Gewebeschnitten des SON der Anteil an c-Fos-positiven Zellen, welche gleichzeitig nNOS-positive Immunreaktivität aufwiesen wesentlich höher ausgeprägt (64-75 %) als in den zuvor untersuchten Gebieten und Substrukturen (*Abbildung 52E*). Sowohl die beiden AngII-Versuchsgruppen mit $34,8 \pm 15,5$ (AngII) und $28,0 \pm 6,6$ (AngII+PyrAp13) und die nur mit PyrAp13-applizierten Versuchstiere mit $28,5 \pm 6,6$, zeigten in diesem Gebiet eine Tendenz zu gegenüber der aCSF-Kontrolle leicht erhöhten Werten für die c-Fos-positiven Zellen. Diese Tendenz war auch für die mit nNOS co-lokalisierten Zellen ausgeprägt, jedoch konnten im SON generell keine signifikanten Unterschiede zwischen allen untersuchten Gruppen festgestellt werden.

Im Bereich des SCN konnte keine Immunreaktivität für nNOS festgestellt werden. Deshalb beschränkte sich die Auswertung hier nur auf die c-Fos-positiven Zellen der einzelnen Versuchsgruppen. Dabei zeigten in dieser Region interessanterweise beide mit PyrAp13 behandelten Gruppen mit $119,8 \pm 38,4$ (AngII+PyrAp13) bzw. $119,8 \pm 43,0$ (PyrAp13) gegenüber den beiden anderen Gruppen mit $56,2 \pm 24,8$ (AngII) bzw. $77,6 \pm 15,0$ (aCSF) erhöhte c-Fos-immunpositive Zellzahlen (*Abbildung 52F*). Dieser Trend war jedoch erneut nicht signifikant ausgeprägt.

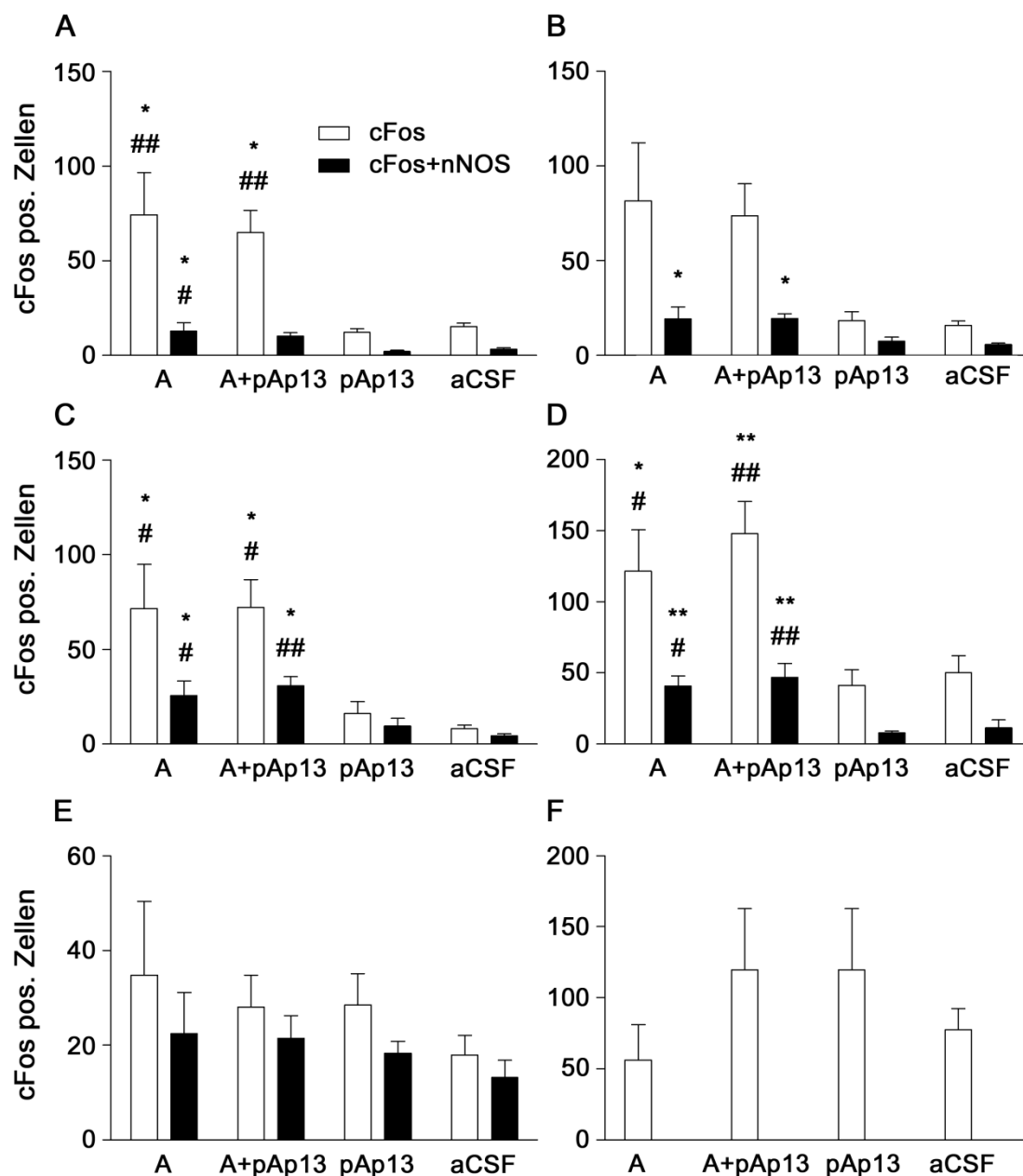


Abbildung 52: Induktion des Transkriptionsfaktors *c-Fos* in (nicht) nitrergen Neuronen hypothalamischer Kerngebiete nach intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Mikroapplikation von Angiotensin II (A) und PyrAp13 (pAp13) bei der Ratte.

Anzahl *c-Fos* immunpositiver Zellen (weiße Balken) und *c-Fos* immunpositiver nNOS-Neurone (schwarze Balken) 90 min nach den i.c.v. Injektionen von AngII (40 pmol), PyrAp13 (20 nmol), AngII+PyrAp13 sowie artifiziereller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF). Diese wurden durch die quantitative Auswertung von 3-8 Aufnahmen immunfluoreszenzmarkierter Gehirngewebeschnitte pro Tier und Nucleus bestimmt. (A-C) Darstellung der Zellzahlen im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (PVN) mit (A) periventriculärer, (B) parvozellulärer und (C) magnozöllulärer Substruktur, im (D) Nucleus praeopticus medianus, (E) Nucleus supraopticus und (F) Nucleus suprachiasmaticus. $n=4-6$ Statistische Signifikanzanalyse: One-way ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls post-hoc test. $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ A bzw a+PyrAp13 versus PyrAp13 oder $\#p \leq 0,05$ und $\#\#p \leq 0,01$ im Vergleich zu aCSF.

3. Modulierende Wirkung von zentralem PyrAp13 auf die circadianen Rhythmen von Körperkerntemperatur, Futter-/Wasseraufnahme und lokomotorischer Aktivität

Die i.c.v. Mikroinjektion von PyrAp13 (20 nmol) ergab bei einem Applikations-Zeitraum zwischen zehn und elf Uhr keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Futter-/Wasseraufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe mit aCSF-Applikation (*Abbildung 47*). Aufgrund der bekannten Nachtaktivität bei Nagetieren findet jedoch ein Großteil der Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme zu Beginn und während der nächtlichen Aktivitätsphase statt. Aufgrund dessen wurde eine abschließende Versuchsreihe durchgeführt, welche die zentrale Injektion von PyrAp13 direkt vor Beginn der Nachtphase zum Inhalt hatte. Um einen möglichen Effekt auf Futter- und Wasseraufnahme zu verstärken wurde zusätzlich vor der dritten PyrAp13 i.c.v. Injektion eine 24-stündige Nahrungs- und Trinkwasser-Restriktion durchgeführt.

3.1 Modulation der circadianen Rhythmik der Körperkerntemperatur

Zu Beginn der telemetrischen Aufzeichnung zeigten beide Versuchsgruppen PyrAp13 bzw. aCSF i.c.v. über einen Zeitraum von zwei Tagen gleichförmig ausgeprägte circadiane Schwankungen der Körperkerntemperatur (T_b) (*Abbildung 53*). Unmittelbar nach der ersten i.c.v. Injektion (I.) um 11:00 Uhr vormittags kam es in beiden Versuchstiergruppen mit $0,39 \pm 0,15$ °C (aCSF) bzw. $0,44 \pm 0,19$ °C (PyrAp13) zu einem kurzen, stressbedingten Anstieg der T_b während der eigentlichen Ruhephase der Tiere. Vier Std. nach der Injektion zeigten die mit PyrAp13-behandelten Tiere einen etwa drei Std. andauernden Anstieg der T_b mit einem Maximum bei $+0,85 \pm 0,19$ °C (PyrAp13) verglichen mit $0,61 \pm 0,28$ °C bei der aCSF-Kontrollgruppe. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant ausgeprägt ($p > 0,05$). Beide Gruppen zeigten somit eine verlängerte Phase erhöhter Körpertemperatur. Nach Ablauf dieses Zeitraums zeigten beide Gruppen wieder einen synchronen Temperaturverlauf und es konnten keine weiteren Unterschiede bis zur nächsten Behandlung beobachtet werden.

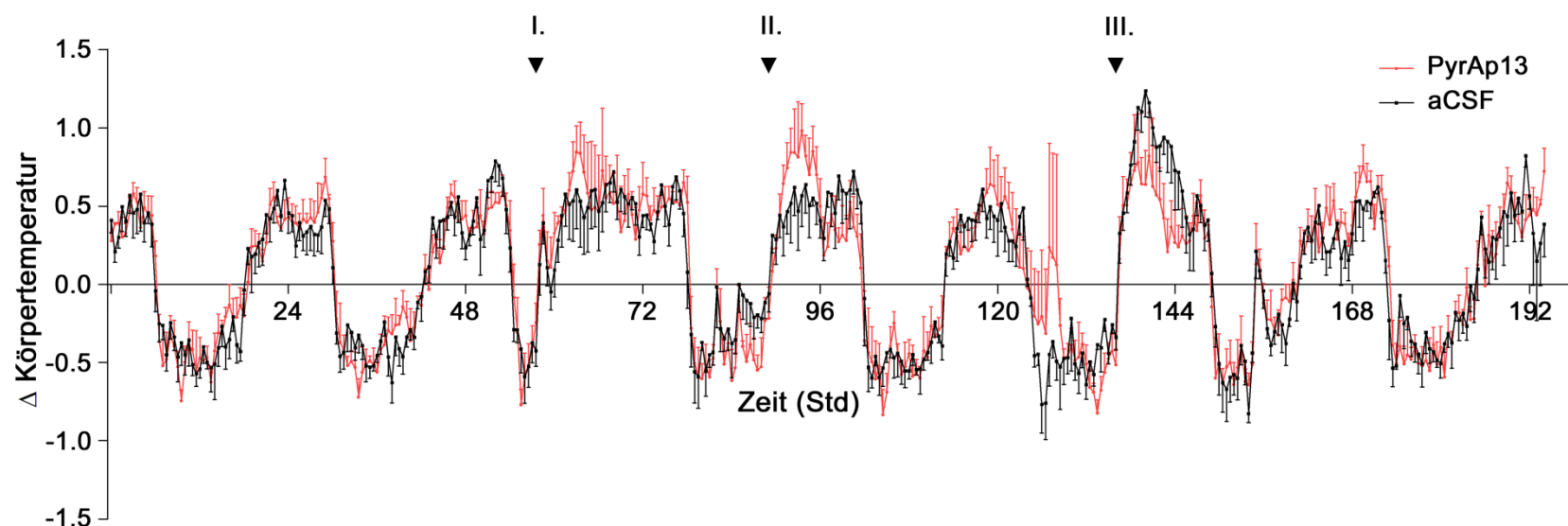


Abbildung 53: Zeitlicher Verlauf der Körperkerntemperaturen als ΔT_b -Werte über mehrere Tage mit intracerebroventrikulären (i.c.v.) Mikroapplikation von pyroglutamylisiertem Apelin13 (PyrAp13) oder artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) bei der Ratte.

Die Abweichung der Körperkerntemperatur post injectionem wurde relativ zum 24 Std.-Mittelwert drei Tage vor der ersten Injektion jedes Tieres als ΔT_b -Wert ermittelt. Alle Tiere erhielten entweder i.c.v. PyrAp13 (20 nmol) oder aCSF im Rahmen von drei hintereinander folgenden Injektionen (Pfeile). Die Erste (I.) erfolgte morgens um 11:00 Uhr. Dreißig Std. danach wurde die zweite Behandlung (II.) 30 min. vor „lights out“ vorgenommen. Am darauffolgenden nächsten Abend wurde den Tieren für 24 Std. Futter und Wasser entzogen. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wurde die dritte Injektion (III.) vorgenommen, anschließend wieder Zugang zu Futter und Wasser gewährt und die Daten weiter aufgezeichnet. Einzelne 5-min Messwerte wurden pro Tier zu 30-min Werten zusammengefasst und anschließend als Mittelwerte \pm S.E.M. der Versuchsgruppen dargestellt; $n=4-5$. Statistische Signifikanzanalyse: Two-way ANOVA (repeated measures) mit Newman-Keuls post-hoc test: Für alle untersuchten Zeiträume: $p>0,05$.

Auch nach der zweiten, unmittelbar vor Beginn der Aktivitätsphase der Tiere (17:00 Uhr) erfolgten, Injektion (II.) kam es zu einem erneuten Anstieg der Körpertemperatur vorrangig in der PyrAp13-injizierten Gruppe 1-2 Std. nach der Injektion und somit früher als nach der morgendlichen Injektion (I.). Das Maximum dieser etwa fünf-stündigen Hyperthermie lag dabei mit $0,98 \pm 0,17$ °C (PyrAp13) im Vergleich zu $0,57 \pm 0,20$ °C bei der mit aCSF mikroapplizierten Versuchsgruppe zum gleichen Zeitpunkt ($p > 0,05$). Nachfolgend verlief die mittlere Tb der beiden Versuchsgruppen sowohl in der folgenden Tag- als auch der nächsten Nachtphase wieder synchron. Beim anschließenden Übergang der Nachtphase zur folgenden Tagphase konnte eine Tendenz zu einer leicht erhöhten Temperatur der zuvor mit PyrAp13 behandelten Gruppe festgestellt werden ($p > 0,05$).

Nach der Durchführung der dritten Injektion (III), 48 Std. später (17:00 Uhr) konnte bei den PyrAp13-mikroapplizierten Versuchstieren zu Beginn der Dunkelphase eine marginale Reduktion des nocturnal bedingten Temperaturanstiegs von $0,91 \pm 0,18$ °C bei den Kontrolltieren um $0,20 \pm 0,24$ °C verzeichnet werden. Gegen Ende der Nacht glichen sich jedoch beide Kurven wieder an und verliefen für den Rest der aufgezeichneten Zeit konsistent zueinander.

3.2 Modulation der nächtlichen Futter-/Wasseraufnahme

Aufgrund der Fieberreaktion einiger Tiere auf die erste am Morgen stattgefundene i.c.v. Injektion konnte die Auswertung dieses Teils des Versuchs aufgrund ungenügender n-Zahlen nicht dargestellt werden. Außerdem wurden keine Unterschiede zu den bereits zu diesem Zeitpunkt stattgefunden Versuchen der ebenfalls in der vorliegenden Arbeit erfolgten LPS-Studie erwartet.

Die mit i.c.v. PyrAp13-mikroapplizierte Versuchsgruppe zeigte auf die zweite Injektion am Abend des Folgetages eine, im Vergleich zu den vorher ermittelten Normalwerten, im Zeitraum der ersten sechs Stunden um $26,4 \pm 11,1$ % Futter- bzw. mit $34,2 \pm 13,8$ % reduzierte Wasseraufnahme (*Abbildung 54A+D*). Die mit aCSF-mikroinjizierten Kontrollen zeigten hingegen keine Veränderung gegenüber ihren Normalwerten der Futter- ($15,0 \pm 12,2$ %) und Wasseraufnahme ($4,9 \pm 7,6$ %).

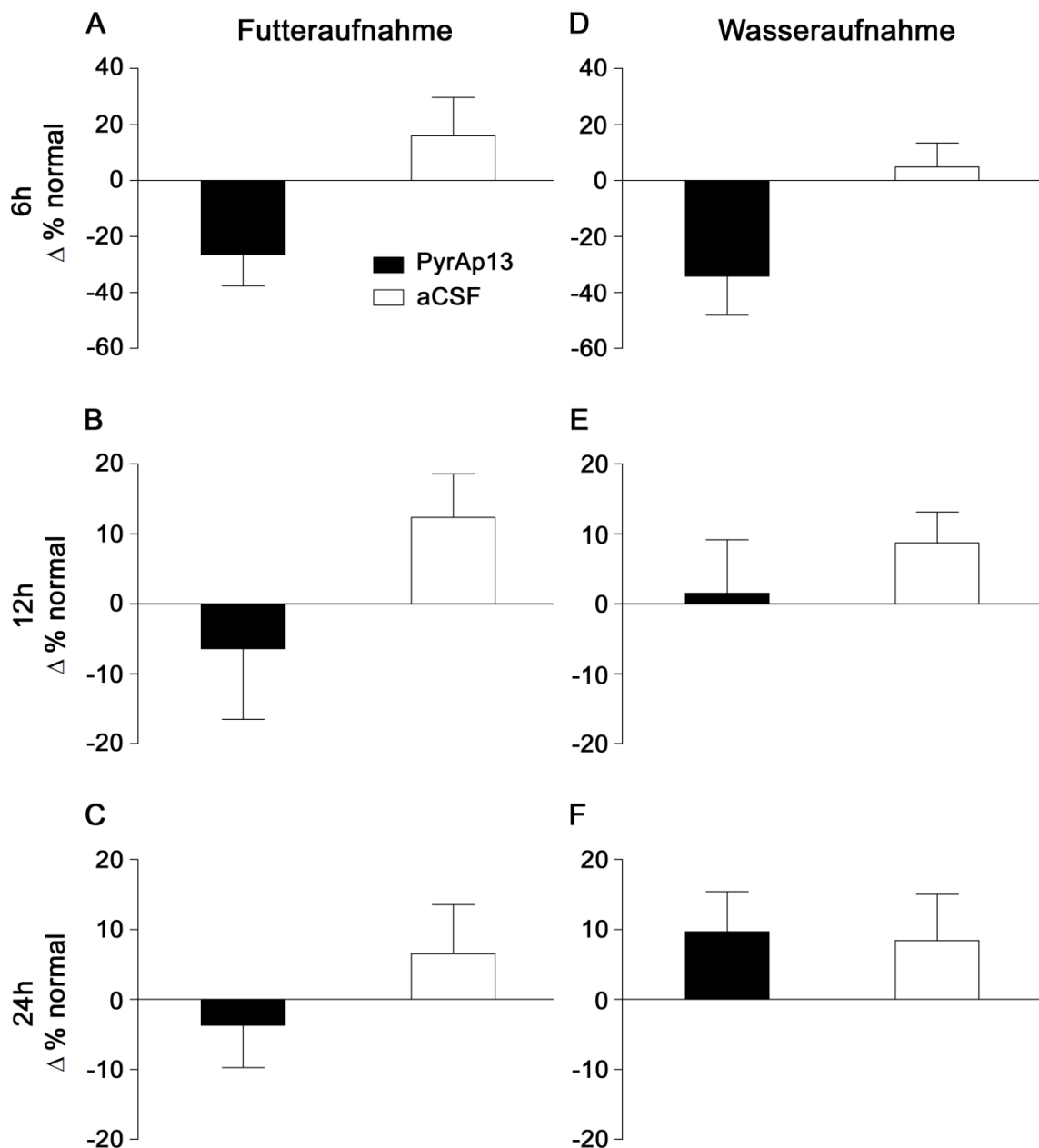


Abbildung 54: Auswirkung intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Mikroinjektionen von pyroglutamyliertem Apelin13 (PyrAp13) vor Beginn der nächtlichen Aktivitätsphase auf die kumulative Futter- und Wasseraufnahme bei der Ratte.

Effekt auf die kumulative Futter- bzw. Wasseraufnahme über (A+D) 6h, (B+E) 12 Std. und (C+F) 24 Std. nach den Injektionen von PyrAp13 (20 nmol, schwarze Balken, $n=4$) oder artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF, weiße Balken, $n=4$) 30 Minuten vor „lights out“. Alle Daten sind als Mittelwerte der prozentualen normalen Aufnahme \pm S.E.M. jedes Tieres zu vergleichbaren Zeiträumen vor den Injektionen dargestellt. Statistische Signifikanzanalyse: *t*-test für unverbundene Stichproben: Für alle untersuchten Zeiträume: $p>0,05$.

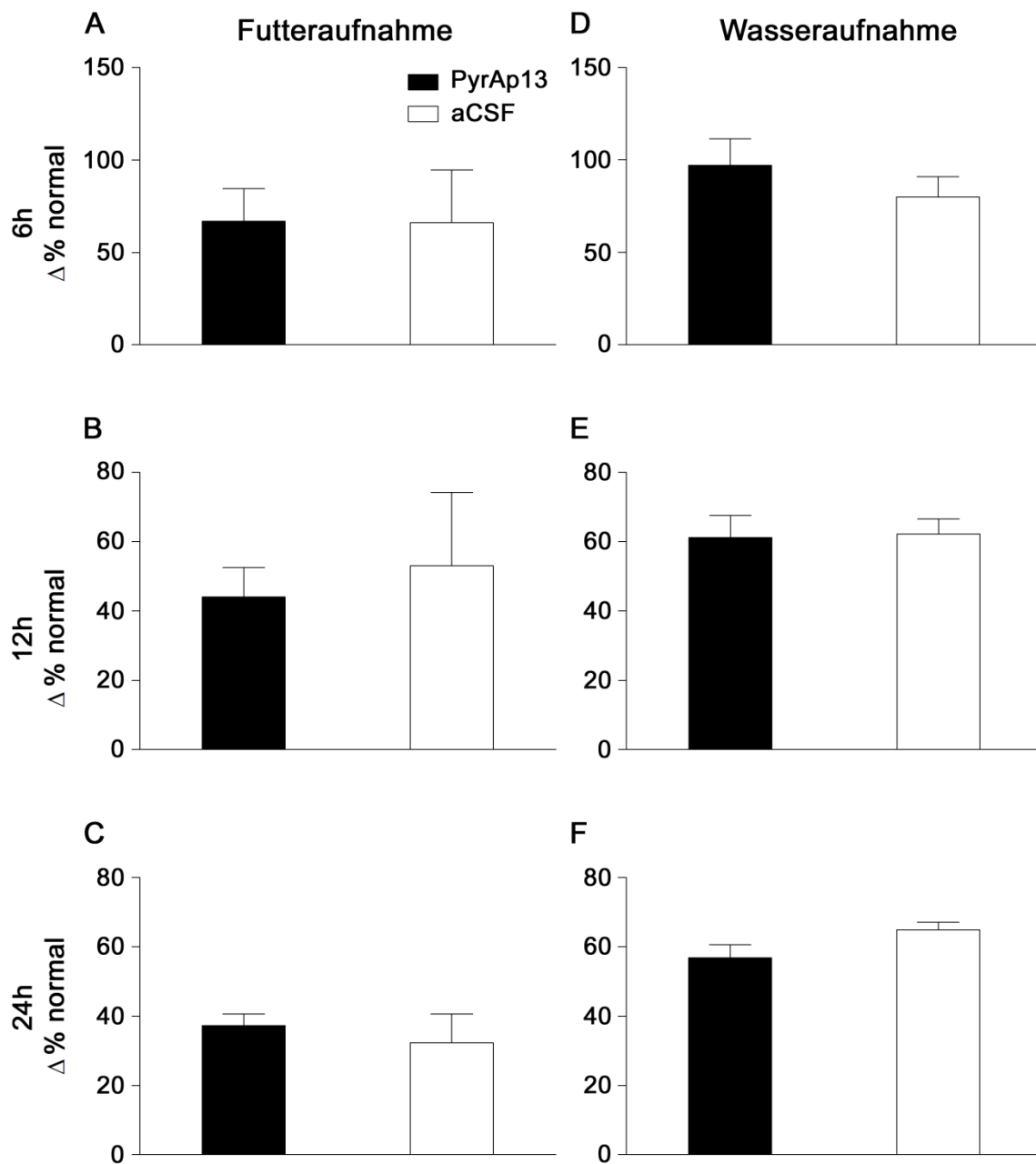


Abbildung 55: Wirkung intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Mikroapplikation von pyroglutamyliertem Apelin13 (PyrAp13) vor Beginn der nächtlichen Aktivitätsphase mit vorheriger 24stündiger Restriktion von Futter und Wasser auf die kumulative Futter- und Wasseraufnahme bei der Ratte.

Effekt auf die kumulative Futter- bzw. Wasseraufnahme über (A+D) 6h, (B+E) 12 Std. und (C+F) 24 Std. nach den Injektionen von PyrAp13 (20 nmol, schwarze Balken, $n=5$) oder artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF, weiße Balken, $n=4$) 30 Minuten vor „lights out“ mit vorheriger 24stündiger Restriktion von Futter- und Wasser. Alle Daten sind als Mittelwerte der prozentualen normalen Aufnahme \pm S.E.M. jedes Tieres zu vergleichbaren Zeiträumen vor den Injektionen dargestellt. Statistische Signifikanzanalyse: t -test für unverbundene Stichproben: Für alle untersuchten Zeiträume: $p>0,05$.

Dieser Unterschied war jedoch für beide Parameter nicht signifikant ausgeprägt ($p > 0,05$). Für die kumulative Futter- und Wasseraufnahme innerhalb zwölf Stunden nach der Injektion konnte eine Tendenz zu erhöhten Werten der aCSF-mikroapplizierten Kontrollgruppe mit $12,4 \pm 6,26$ % bzw. $8,7 \pm 4,0$ % festgestellt werden. Die PyrAp13-mikroinjizierten Tiere hingegen zeigten mit $-6,4 \pm 10,1$ % bzw. $1,5 \pm 7,7$ % keine Veränderung. Auch diese Unterschiede erwiesen sich bei der statistischen Varianzanalyse als nicht signifikant ($p > 0,05$). Innerhalb der 24-stündigen kumulativen Aufzeichnungsperiode ergaben sich für die Werte der Futter- und Wasseraufnahme keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

Beim Vergleich der Daten für die Futter- und Wasseraufnahme nach der dritten Injektion mit vorheriger Restriktion von Futter und Wasser ergaben sich in allen untersuchten Zeitspannen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (*Abbildung 55*).

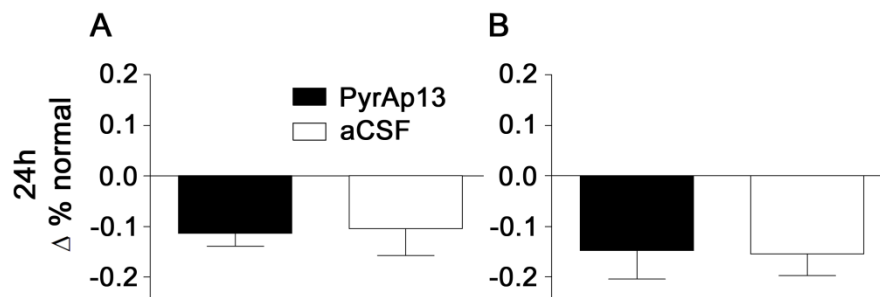


Abbildung 56: Wirkung intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Mikroinjektion von pyroglutamyliertem Apelin13 (PyrAp13) auf die kumulative 24h Aktivität bei der Ratte.

*Kumulative 24Std.-Gesamtaktivität (A) ohne Restriktion und (B) mit vorheriger 24-stündiger Futter-/Wasserrestriktion nach Mikroinjektion von i.c.v. PyrAp13 (20 nmol, schwarze Balken, $n=4-5$) oder artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF, weiße Balken, $n=4-5$) 30 Minuten vor lights out. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M. in Prozent der Normalaktivität aus vergleichbaren Zeiträumen vor den Injektionen dargestellt. Statistische Signifikanzanalyse: *t*-test für unverbundene Stichproben: Für alle untersuchten Zeiträume: $p > 0,05$.*

Im Zeitraum von sechs Stunden nach der Injektion zeigte die PyrAp13-mikroapplizierte Versuchsgruppe mit $96 \pm 14,4$ % jedoch gegenüber den Kontrollen mit $79,8 \pm 11,2$ % eine Tendenz zu leicht erhöhter Wasseraufnahme (*Abbildung 55D*). Dieser Effekt kehrte sich bei der Betrachtung der kumulativen Aufnahme von 24 Std. jedoch um, hier zeigten im Gegensatz dazu die Kontrolltiere mit $64,8 \pm 2,1$ % gegenüber den Versuchstieren mit

PyrAp13 mit $56,8 \pm 3,8$ % leicht erhöhte Werte (*Abbildung 55F*). Diese beiden Tendenzen bei der Wasseraufnahme der Tiere zeigten jedoch, wie bereits erwähnt, keine signifikante Ausprägung. Die absoluten Mengen der Futteraufnahme der beiden Versuchsgruppen unterschieden sich im Gegensatz dazu in keinem der untersuchten Zeiträume voneinander.

3.3 Modulation der lokomotorischen Aktivität

Auch für die Auswertung der lokomotorischen Gesamtaktivität konnten die Daten der ersten Injektion aufgrund der akuten Fieberreaktion einiger Tiere auf die i.c.v. Injektionen nicht verwendet werden.

Bei beiden vor Beginn der Aktivitätsphase durchgeführten Injektionen kam es in allen Gruppen zu einer Abnahme der kumulativen Gesamtaktivität in einem Zeitraum von 24 Stunden (*Abbildung 56*). Nach der zweiten Injektion betrug diese circa 10%, bei der Dritten fiel sie minimal höher aus. Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen konnten für beide Injektionen nicht beobachtet werden.

D. Diskussion

I. Nachweis von Apelin auf Proteinebene

Für die Detektion der Apelin17-spezifischen Signale wurde nur eine Serie an Gefriergewebeschnitten des Gehirns zweier Ratten markiert. In den Nuclei und Substrukturen des Hypothalamus wurden nur wenige immunreaktive zelluläre Strukturen detektiert. Dazu zählten der magnozelluläre Teil des PVN, der *Plexus choroideus* und der Subnucleus der *Stria terminalis*, im angelsächsischen Sprachgebrauch als „*Bed nucleus*“ der *stria terminalis* (BNST) bezeichnet. Weiterhin konnten nur vereinzelt für dieses Peptid positive Faserstrukturen /Punctata beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Reaux et al. (2002). Sie berichteten auch über eine Detektion in Zellkörpern im magnozellularen Teil des PVN und konnten darüber hinaus in der medialen und lateralen präoptischen Region, dem *Nucleus supraopticus* (SON) und vor allem im *Nucleus arcuatus* (ARC) Immunreaktivität in Zellkörpern nachweisen (Reaux et al., 2002). Zusätzlich wurden noch weitere Regionen mit Immunreaktivität in Zellkörpern und Faserstrukturen beschrieben. Durch die Vorbehandlung der Tiere mit Kolchizin konnten die Autoren wahrscheinlich eine bessere Konservierung der Apelinsignale in Zellkörpern und –fasern des neuronalen Gewebes erreichen. Weiterhin verwendeten sie zur Fixierung des Gewebes Zamboni's Lösung mit einem hohen Anteil von 15 % an Pikrinsäure. Beide Protokolle wurden in dieser Arbeit nicht angewandt, was möglicherweise den Unterschied in der Intensität der Immunreaktivität erklären könnte. Eigene Versuche zur Verwendung von Pikrinsäure, jedoch nur mit einem Volumenanteil von 0,5 % in der Perfusionslösung, ergaben keinen Unterschied hinsichtlich der Stärke der Immunreaktivität. Als weitere Diskrepanz verwendeten Reaux et al. (2002) für die Detektion des Apelin17-Signals einen eigenen Antikörper. Dieser zeigte eine hohe Kreuzreaktivität für alle anderen aktiven Apelinfragmente (De Mota et al., 2004). Deshalb bezog sich die Angabe der Detektion von Apelin-IR in den zahlreichen Faser- und Zellstrukturen vermutlich auch auf alle anderen Apeline. Der für die Markierungen in dieser Arbeit verwendete Antikörper für Apelin17 war kommerziell erhältlich und weist laut Firmenangaben keinerlei Kreuzreaktivität für Apelin15 und Apelin13 auf. Er detektierte somit hauptsächlich Apelin17, möglicherweise zusätzlich Apelin36 und eventuell das Prepropeptid. Aufgrund all dieser Unterschiede ist es durchaus möglich, dass die hier gezeigte Apelin17-IR wesentlich diskreter verteilt erscheint als eine vergleichbare Apelin-IR unter Einschluss von Apelin13 in der Fachliteratur (Reaux et

al., 2002). Für diese These spricht auch eine Untersuchung, welche für menschliches Apelin36 spezifische Immunreaktivität im Gehirn der Ratte untersuchte und diese ebenfalls auf wenige „prominente“ Gebiete beschränkt vorfand (Brailoiu et al., 2002).

Im Gegensatz zu Apelin17 deckt sich die für Apelin13 in dieser Arbeit beschriebene Immunreaktivität größtenteils mit bereits in der Literatur beschriebenen Peptidkartierungen (De Mota et al., 2000l; Reaux et al., 2001; Reaux et al., 2002; Reaux-Le Goazigo A. et al., 2007). So konnte Apelin13 wie in der zuvor genannten Fachliteratur berichtet, unter anderem in allen Teilen des PVNs, im SON und im MnPO nachgewiesen werden. Bei dieser Isoform des Apelins konnten ebenfalls, wie bei Apelin17, allgemein nur wenige Apelin-IR Faserstrukturen und immunreaktive zelluläre Strukturen detektiert werden. Möglicherweise lag dies ebenfalls an der, in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführten, Vorbehandlung mit Kolchizin und der Perfusion und der Fixierung des Gewebes mit hohem Pikrinsäureanteil. In der vorliegenden Arbeit konnte im Zwischenlappen der Hypophyse eine ausgeprägte Signalstärke für Apelin13 und im Vorderlappen einzelne Apelin13-IR Zellen ermittelt werden. In der Literatur hingegen gibt es zur Apelin-IR in den Substrukturen der Hypophyse unterschiedliche Aussagen. Für die Detektion von Apelin36 wurde über ausgeprägte Immunreaktivität im HVL sowie HHL berichtet (Brailoiu et al., 2002). Im Zusammenhang mit der Co-Lokalisation mit klassischen Hormonen des HVLs wurde eine Apelin36-spezifische Lokalisation im HVL und HHL ermittelt (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2007). Möglicherweise zeigen diese Ergebnisse, anhand der verschiedenen verwendeten Antikörper, auch eine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Peptidfragmente in der Hypophyse an. Über die Lokalisation Apelin36-positiver Zellen am Rand von Blutgefäßen des Gehirns wurde bereits berichtet (Brailoiu et al., 2002). Dieses Ergebnis konnte für die Immunfluoreszenzmarkierung mit dem Apelin12-spezifischen Antikörper in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Möglicherweise handelte es sich deshalb bei diesen Zellen ebenfalls um Apelin36-positive Zellen.

Die eindeutige physiologische Rolle der unterschiedlichen Peptidfragmente und ihre Prozessierung sind bis heute nicht geklärt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen physiologischen und biochemischen Eigenschaften am Rezeptor wäre deshalb eine unterschiedliche Gewebeverteilung durchaus denkbar. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, müssten dazu jedoch für jedes Apelinpeptid spezifische Kartierungen erstellt werden. Mögliche Unterschiede zwischen den in der Literatur beschriebenen Studien zur Verteilung der Apelinpeptide und der vorliegenden Untersuchung ließen sich deshalb vermutlich

hauptsächlich auf die unterschiedlichen Fixierungsmethoden des Gewebes und die verwendeten Antikörper zurückführen.

Im Methodenteil ihrer Veröffentlichung berichteten De Mota et al. (2004) über eine erhöhte Konzentration von Apelin im Hypothalamus von Sprague-Dawley Ratten ($18,0 \pm 4,9$ pmol/g Gewebe) verglichen mit Wistar-Kyoto Ratten ($3,2 \pm 0,7$ pmol/g Gewebe). Deshalb sei für Sprague-Dawley Ratten eine Kolchizinbehandlung zur Visualisierung Apelin-positiver Neurone, wie für Wistar-Kyoto Ratten (Reaux et al., 2001; Reaux et al., 2002) verwendet, nicht notwendig. Im Gegensatz zu dieser Aussage konnten anhand immunhistochemischer Untersuchungen in einem Vergleichsversuch der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der Apelin13- bzw. Apelin17-spezifischen Immunfluoreszenz zwischen beiden Rattenstämmen festgestellt werden. Diese Untersuchung beruhte auf dem mikroskopischen Vergleich gefärbter Gewebeschnitte zweier Tiere. Es wurde also nur die Qualität und nicht die absolute Quantität des Signals verglichen. Trotzdem hätte eine circa sechsfach erhöhte Signalstärke sicherlich bemerkt werden müssen. Woher, mit welcher Methode und welcher n-Zahl die Ergebnisse von De Mota gewonnen wurden ist aus der Publikation nicht ersichtlich. Offensichtlich stammten diese Ergebnisse aus einem Vorversuch und es wurde zur Detektion ein Radioimmunoassay (RIA), wie in der Publikation für andere Ergebnisse beschrieben, verwendet. Weiterhin wurde keine Angabe bezüglich der Art des detektierten Apelins gemacht.

II. Nachweis des Apelinrezeptors auf Protein- und mRNA-Ebene

Zum Nachweis des Apelin-Rezeptors APJ im Gehirn der Ratte wurde eine ausführliche immunhistochemische Kartierung dieses Rezeptors in hypothalamischen und thalamischen Strukturen vorgenommen.

Um die Spezifität der in der vorliegenden Arbeit für die neurohistologischen Kartierungsstudien verwendeten Antikörper APJ-R und APJ-G zu gewährleisten, wurden verschiedene Kontrollmarkierungen mit diesen durchgeführt. So konnte bei den APJ-Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen an fixierten Gehirnschnitten mit den beiden Antikörpern bei der qualitativen Auswertung unter dem Mikroskop eine deutliche Übereinstimmung der immunreaktiven Signale eruiert werden (*Erg. Kap. II.1.1*). Dies war auch bei der quantitativen Auswertung der entsprechenden Doppelmarkierungen in der primären HZL-Kultur gegeben (*Erg. Kap. II.1.2*). Zusätzlich waren nach der Absättigung des

für die Kartierungsstudie des APJ-Rezeptors verwendeten APJ-R Antikörpers mit der zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenz keine Fluoreszenzsignale mehr vorhanden (*Erg. Kap. II.1.3*). Weiterhin zeigten die Kontrollmarkierungen der für die Immunfluoreszenzmarkierungen am Gewebe verwendeten Zweitantikörper ohne den Erstantikörper für APJ keine unspezifische Bindungsaktivität. All diese Kontrollen deuten somit auf eine APJ-spezifische Markierung bei Verwendung dieses Antikörpers.

Der Apelinrezeptor APJ weist mit 86 Aminosäuren (54%) im Bereich der transmembranösen Strukturen eine hohe Sequenzhomologie zum Typ1A-Angiotensinrezeptor (Agtr1) (O'Dowd et al., 1993) auf. Die 16 Aminosäuren umfassende Bindungssequenz des APJ-R Antikörpers liegt hinter der fünften Transmembran-Domäne des Rezeptors. In diesem Bereich zeigen APJ und Agtr1 der Ratte Übereinstimmung in nur einer einzigen Aminosäure (*Abbildung 57*). Anhand dieser für APJ spezifischen Antikörperbindungsstelle im Alignment von APJ und Agtr1 erscheint somit eine Detektion von Agtr1 durch den APJ-R Antikörper trotz der hohen Sequenzübereinstimmung unwahrscheinlich.

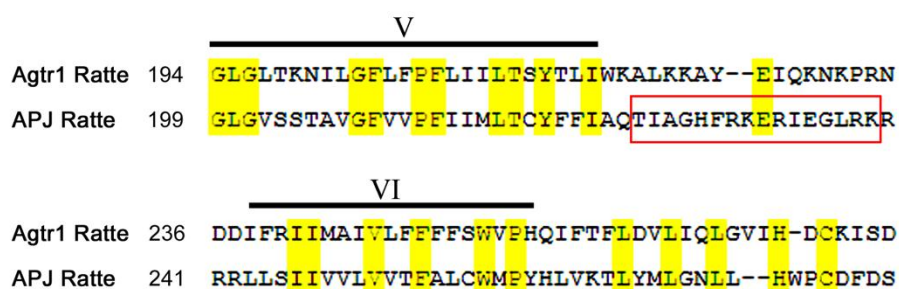


Abbildung 57: Ausschnitt des Alignments von Agtr1- und APJ-Rezeptor der Ratte mit Bindungssequenz des APJ-R Antikörpers (roter Kasten) zwischen V. und VI. transmembranaler Domäne.

Anhand einer Western Blot Analyse sollte zum einen die zuvor in immunhistochemisch markierten Gewebeschnitten nachgewiesene starke Expression des Rezeptors im Hypophysenzwischenlappen der Ratte bestätigt werden. Weiterhin sollte dadurch überprüft werden, ob sich durch diese Methode mit dem benutzen APJ-R Antikörper Banden mit den in der Fachliteratur beschriebenen Molekularmassen (kDa = Kilodalton) in der SDS-PAGE nachweisen lassen. Bei dem Western Blot für APJ ergaben sich Banden mit Molekularmassen von: 41,8, 49,5, 68,6 und 82,8 kDa (*Erg. Kap. II.2*). Ein Berechnungsmodul für die Molekülmasse eines Proteins (http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html) errechnete

bei Eingabe der menschlichen FASTA APJ-Proteinsequenz eine Molekülmasse von 42,66 kDa. Dies würde ungefähr der Größe der ersten detektierten Bande in dieser Arbeit entsprechen. Puffer et al., (2000) zeigten in kultivierten, mit APJ transfizierten HEK-293T Zellen nach vorheriger Behandlung ihrer Proben bei nur 37°C unter anderem ebenfalls eine Bande genau in dieser Größe. Weitere Publikationen bestätigten diese Molekülmasse im Western Blot in Aortagewebe von *db/db* Mäusen (Zhong et al., 2007) und in kultivierten menschlichen vaskulären glatten Muskelzellen (Cui et al., 2010).

Trotzdem existieren zur Größe der APJ-Bande(n) in der Literatur auch abweichende Angaben. Zwei weitere Publikationen zeigten Versuche mit Banden in einer Größe 50 und 60 kDa in transfizierten HEK-293 Zellen (Medhurst et al., 2003) bzw. im Myokard der Ratte (Atluri et al., 2007). Das größere der beiden Signale wurde dabei als glycosilierte Form des Rezeptors angegeben. Puffer et al. (2000) konnten in überexprimierenden Zellen und später Atluri et al. (2007) im Myokardgewebe anhand von Glycosilierungsinhibitoren zeigen, dass der Rezeptor in ihren Versuchen tatsächlich auch in der höher molekularen glycosilierten Form vorlag. Aufgrund von *in silico* Analysen wurden zwei N-Glycosilierungsstellen für den APJ-Rezeptor vorhergesagt (De Mota N. et al., 2000). Möglicherweise könnte es sich bei der in dieser Arbeit detektierten Bande von 49,5 kDa um eine entsprechend modifizierte Rezeptorpopulation handeln. In der Bande mit 82,8 kDa könnte möglicherweise ein Dimer oder einen Heterodimer mit einem anderen Rezeptor, wie bereits für APJ und den AT1R beschrieben (Chun et al., 2008), vorliegen. Die teils unterschiedlichen Ergebnisse der dargestellten Studien wurden durch verschiedene Methoden in diversen Geweben und transfizierten sowie nativen Zellkulturen gewonnen. Aufgrund der Diversität dieser Daten bleibt deshalb die tatsächliche Molekülmasse der *in vivo* in natürlicher Expression auftretenden Formen des Rezeptors kontrovers diskutiert.

Durch *in situ*-Hybridisierungen konnten APJ und Preproapelin als mRNA im PVN von adulten Ratten detektiert werden (Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; De Mota et al., 2000). Durch eigene Untersuchungen konnte dies auf Protein-Ebene durch die immunhistochemische Kartierung bestätigt werden (*Erg. Kap. II.4.1*). Weiterhin wurde durch diese Studie auch im MnPO eine hohe Faserdichte für APJ ermittelt. Die durchgeführte RT-PCR sollte deshalb dazu dienen, die mRNA des Rezeptors und des Peptids in den Proben der aus neonatalem Gehirngewebe der Ratte erstellten MnPO-/PVN-Kultur und auch den entsprechenden Gewebestücken nachzuweisen.

Da es in der vorliegenden Arbeit lediglich darum ging, durch PCR-Analyse den qualitativen Nachweis für die Expression APJ-spezifischer mRNA in den Kerngebieten des MnPO und PVN zu erbringen, waren die Schwankungen in Gewicht und mRNA-Gehalt der Ausgangsproben von untergeordneter Bedeutung. Generell ließ sich die APJ-mRNA in den Gewebestücken, vermutlich bedingt durch die größere Masse an Zellen, besser als in den Kulturen nachweisen.

1. Neuroanatomische Betrachtungen zur Funktion von Apelin/APJ im ZNS

Bisher durchgeführte Studien konnten die Expression des APJ-Rezeptors im Gehirn der Ratte hauptsächlich auf mRNA-Ebene nachweisen (Hosoya et al., 2000; Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; De Mota et al., 2000; Reaux et al., 2001; Medhurst et al., 2003). Einige wenige Veröffentlichungen konnten per Rezeptoraudiographie oder die funktionelle Expression des Rezeptors als Bindungsprotein für radioaktiv markiertes Apelin13 in einigen Gehirngebieten teilweise sogar im Bereich des PVN feststellen (Katugampola et al., 2001; Hazell et al., 2011). Darüber hinaus erbrachten (Medhurst et al., 2003) und (Tobin et al., 2008) für die Ratte sowie (Lee et al., 2004) für den Menschen immunhistochemische Darstellungen des APJ-Rezeptors in Neuronen des PVN bzw. SON. Detaillierte Kartierungen der APJ-Verteilung und Expressionsstärke in Substrukturen des Hypothalamus, Thalamus, den septalen und basalen Regionen des Vorderhirns und den circumventrikulären Organen lagen jedoch bisher nicht vor, weshalb die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Rezeptorkartierung angefertigt wurde.

In den Bereichen des septalen und basalen Vordergehirns wurde vor allem im medialen Teil des Subnucleus der *Stria Terminalis*, (= *Bed nucleus der stria terminalis* (BNST)), eine der höchsten Dichten an APJ-IR Faserdichten beobachtet. Im lateralen Bereich des BNST und dabei speziell in dessen dorsaler Komponente (STLD) hingegen konnten sogar APJ-positive Zellkörper dargestellt werden. Die Expression von APJ-Protein oder mRNA wurden bisher in dieser Substruktur des BNST nicht beschrieben. Jedoch konnte eine hohe Expression von Apelin17 speziell in der lateralen und medialen Subdivision dieses Kerngebietes in Übereinstimmung mit der in der vorliegenden Kartierungsstudie gezeigten Rezeptorverteilung nachgewiesen werden (Reaux et al., 2002). Der BNST ist eine sexuell dimorphe Struktur des

limbischen Systems welche unter anderem bei der Kontrolle von sexuellem Verhalten und der Sekretion von Gonadotropinen eine Rolle spielt (Allen und Gorski, 1990; Hines et al., 1992). Weiterhin ist der BNST eine wichtige Struktur für die Vermittlung von Angst und Besorgnis (Duvarci et al., 2009). Während der letzten Jahre konnten Publikationen zusätzlich eine wichtige Rolle für den Nucleus bei der Regulation der HPA-Achse während akutem und chronischem Stress zeigen (Herman und Cullinan, 1997; Choi et al., 2008; Bingham et al., 2011). Die mediale Division des BNST zeigt Projektionen zu Regionen, welche an der Regulation des sexuellen Verhaltens und der neuroendokrinen Sekretion involviert sind (Krettek und Price, 1978). Möglicherweise spielt deshalb das apelinerge System auch in der Kontrolle dieser eine wichtige Rolle, da gerade in diesem Teil des BNST in der Kartierungsstudie für APJ die mit am stärksten ausgeprägte Dichte an APJ-positiven Faserstrukturen beobachtet werden konnte.

Im Gegensatz zur medialen wurden in der lateralen Division des BNST weniger APJ-immunreaktive Faserstrukturen detektiert. Jedoch konnten sowohl APJ- als auch Apelin17-Immunreaktivität in Somata der Zellen des dorsalen Bereichs dieser Division lokalisiert werden. Die laterale Division zeigt ausgeprägte efferente Projektionen zum lateralen, parvozellulären und paraventriculären Teils des *Nucleus paraventricularis hypothalami* (Dong et al., 2001a; Dong et al., 2001b; Dong und Swanson, 2004). Weiterhin konnten in den zahlreichen Subnuclei des BNST unterschiedliche Zellpopulationen mit Immunreaktivität für die Neuropeptide Somatostatin, Enkephalin, und auch *corticotropin-releasing-factor* (CRF) nachgewiesen werden (Moga et al., 1989). So konnte durch retrogrades Tracing des PVN ein Cluster von CRF-positiven Zellen im ventralen Bereich der lateralen Division des BNST identifiziert werden (Moga und Saper, 1994), welcher im Rahmen der Kartierungsstudie in dieser Division die höchste Dichte an APJ-immunreaktiven Fasern enthielt. Durch Läsionen des posterioren BNST kam es in Experimenten zu erhöhten ACTH und Corticosteron Plasmaspiegeln bei akutem Stress, erhöhter stressinduzierte c-Fos-mRNA Expression und zu erhöhter Expression von CRF- und Vasopressin-spezifischer mRNA im PVN (Choi et al., 2007). Auch für die Effekte von Apelin auf die HPA-Achse konnte eine Abhängigkeit von CRF und Vasopressin gezeigt werden (Newson et al., 2009). Im PVN konnte eine Hochregulation der APJ-spezifischen mRNA durch akuten und wiederholten Stress bei Ratten gezeigt werden (O'Carroll et al., 2003). Möglicherweise spielt so der BNST mit seiner regulativen Funktion der HPA-Achse, der hohen Dichte an APJ-immunreaktiven Fasern und

teilweise auch neuronalen Perikaryen ebenfalls eine wichtige Rolle bei den CRF-vermittelten apelinergen Effekten auf die HPA-Achse.

Als weitere Strukturen mit hoher, APJ-immunpositiver Faserdichte wurden in der Kartierungsstudie der *Nucleus precommissuralis* (PrC) und der *Nucleus paraventricularis thalami* (PVA) im Thalamus und das periventrikuläre Grau (PVG) ermittelt. Für den *N. precommissuralis* existieren sowohl für Apelin als auch APJ keine Angaben in der Literatur. Im Gegensatz dazu wurde im PVA von Reaux et al. (2001, 2002) eine hohe Dichte von Apelin-immunreaktiven Fasern, jedoch keine entsprechenden Zellkörper, beschrieben. Für die weiterhin im Thalamus mit moderater Rezeptorexpression angegebenen Strukturen des *Nucleus reuniens* und des *Nucleus rhomboideus thalami* liegen bisher keine Beschreibungen sowohl zu APJ als auch Apelin in der Literatur vor. In Bezug auf die graue Substanz wurde über eine Verteilung des Apelin-Rezeptors in zahlreichen kortikalen Strukturen des Gehirns der Ratte berichtet (Lee et al., 2000; De Mota et al., 2000; Medhurst et al., 2003). Apelin-positive Fasern hingegen konnten in den kortikalen Bereichen des Telencephalon nicht detektiert werden (Reaux et al., 2002). Im Gegensatz dazu wurde bei den zentral gelegenen Strukturen mit grauer Substanz über die Expression von Preproapelin- und APJ-spezifischer mRNA und Apelin-immunreaktiven Zellkörpern im PAG berichtet (De Mota et al., 2000; Reaux et al., 2002). Interessanterweise führte die intraperitoneale Applikation von Apelin₁₂ (800 µg/kg) bei Ratten zu einer stark erhöhten Expression von c-Fos in Neuronen des BNST und des PVA (Takayama et al., 2008). Die nukleäre Fos-Translokation im PAG war zwar erhöht zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. In all diesen Regionen konnten auch in der Kartierung APJ-positive Strukturen detektiert werden.

Es ist bekannt, dass das PAG an der Regulation des Schmerzempfindens beteiligt ist. So führte eine supraspinale Applikation von Apelin₁₃ zu antinozeptiven Effekten in Mäusen (Xu et al., 2009). Möglicherweise war dies über das PAG vermittelt. Weiterhin führte eine elektrische Stimulation dieses Hirngebietes zu einer Absenkung des Blutdrucks bei einem Schlaganfallpatienten (Patel et al., 2011). Auch die i.c.v. Applikation von Apelin führte dosisabhängig zu einer Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz (Kagiyama et al., 2005). Aufgrund der analogen Effekte spielt das apelinerge System deshalb möglicherweise im PAG eine Rolle bei der Kontrolle des Blutdrucks. Da das PAG eine perzipierende afferente Struktur darstellt, könnte eine derartige Vermittlung über mögliche Efferenzen zum PVN (Pittman et al., 1981) stattfinden.

Die in der Literatur beschriebene, hohe Apelin-immunreaktive Faserdichte im PVA wurde mit möglichen Afferenzen aus dem periventrikulären und paraventrikulären PVN begründet (Reaux et al., 2002). Die ausgeprägte Immunreaktivität für den Apelinrezeptor APJ im Bereich des PVA entspräche somit dem molekularen Ziel für Apelin17. Andererseits konnte für den PVA gezeigt werden, dass seine Neurone efferente Projektionen in den hypothalamischen *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) senden (Moga et al., 1995). Dieser Nucleus gilt als Sitz des circadianen Schrittmachers im Säugetiergehirn (Moore und Eichler, 1972; Stephan und Zucker, 1972). Speziell der anteriore Teil des PVA stellt dabei außerhalb des Hypothalamus eines der Hauptgebiete efferenter Projektionen zum SCN dar (Watts et al., 1987; Watts und Swanson, 1987; Kalsbeek et al., 1993). Eine entsprechende Immunreaktivität für Apelin17 bzw. Apelin36 in diesem Nucleus konnte von Reaux et al. (2002) und Brailoiu et al. (2002) nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde auch für das Pinealorgan, einer weiteren wichtigen Struktur zur Regulation circadianer Rhythmik, ebenfalls über die Expression von Rezeptor- und Preproapelin-mRNA berichtet (Lee et al., 2000; De Mota et al., 2000). Aufgrund der Expression des apelinergen Systems in diesen beiden Strukturen wurde schon früh eine Beteiligung des apelinergen Systems an der Regulation circadianer Rhythmen postuliert (Lee et al., 2000; De Mota et al., 2000; Brailoiu et al., 2002; Reaux et al., 2002). Im Gegensatz dazu konnte jedoch in eigenen Untersuchungen keine Immunreaktivität für Apelin oder APJ in SCN bzw. Pinealorgan nachgewiesen werden, was jedoch eine mögliche regulatorische Funktion des apelinergen Systems auf die Steuerung circadianer Rhythmik, eventuell vermittelt durch den PVA, nicht ausschließt. Beim SCN handelt es sich um einen der wenigen Fälle, bei welchem die beobachteten Rezeptorverteilungen nicht mit der beschriebenen Verteilung des Apelinpeptids übereinstimmen.

Als weiterer funktionaler Aspekt, konnte für den PVA eine Beteiligung an der Regulation bzw. Modulation der HPA-Achse gezeigt werden. So führten Läsionen in der posterioren Division des PVA bei, durch eine zeitweilige Fixierung (*restraint stress*), chronisch gestressten Ratten zu einer verstärkten ACTH-Ausschüttung (Bhatnagar und Dallman, 1998). Durch diese und weitere Läsions-Experimente wurde schließlich eine inhibitorische Funktion des PVA auf die HPA-Achse in Bezug auf Temperaturrehythmus, Futteraufnahme, Gewichtszunahme und subkutane Fettspeicher postuliert (Bhatnagar und Dallman, 1999). Auch für das apelinerge System wurde anhand seiner Expression im PVN und SON und der Effekte auf Vasopressin-, ACTH- und CRF-Freisetzung eine direkte Rolle in der Regulation der HPA vorgeschlagen (O'Carroll et al., 2000; Taheri et al., 2002; O'Carroll et al., 2003). Tatsächlich konnte Apelin die Freisetzung von ACTH *ex vivo* aus der anterioren Hypophyse

stimulieren (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2007). Die starke Expression des Apelin-Rezeptors im PVA deutet somit möglicherweise zusätzlich auf eine Involvierung des apelinergen Systems in der Regulation der inhibitorischen Funktion des PVA auf die HPA-Achse.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Regionen deckte sich die in der Kartierungsstudie für andere hypothalamische Strukturen dargestellte APJ-Expression größtenteils mit der Beschreibung aus bisherigen Veröffentlichungen. Für den *Nucleus supraopticus* (SON) und seinem retrochiasmatischen Teil (SOR) wurden in der Kartierungsstudie weniger Zellen und Fasern mit APJ-IR als im *Nucleus paraventricularis hypothalami* (PVN) beobachtet. Die Expression von Rezeptor und Apelin im SON wurde bereits sowohl auf mRNA- als auch Protein-Ebene in zahlreichen Publikationen beschrieben (Lee et al., 2000; De Mota et al., 2000; Reaux et al., 2001; Brailoiu et al., 2002; Reaux et al., 2002; Medhurst et al., 2003).

Die in der Kartierungsstudie der vorliegenden Arbeit markante Ausprägung von APJ-positiven Zellkörpern im PVN war im magnozellulären Teil gefolgt vom parvozellulären und dem periventrikulären Substrukturen am stärksten ausgeprägt. Zahlreiche Publikationen bestätigen diese Beobachtung und zeigen ebenfalls eine Expression der Rezeptor mRNA vor allem in dessen magno- und parvozellulären Substrukturen (Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; De Mota et al., 2000; Reaux et al., 2001; Medhurst et al., 2003). Auch auf Proteinebene konnte eine Expression, jedoch ohne Beschreibung der Expressionsstärke in den einzelnen Substrukturen, gezeigt werden (Medhurst et al., 2003). Neben dem Nachweis des Rezeptors wurde auch die Expression von Apelin im PVN gezeigt (Reaux et al., 2001; Brailoiu et al., 2002; De Mota et al., 2004). Mögliche funktionelle Aspekte der Expression von APJ im SON und PVN werden bei der Diskussion der Co-Expression mit nNOS erörtert (siehe Kap. II.3).

Auch im *Nucleus arcuatus* (ARC), und dabei speziell im lateralen und medialen Bereich dieses Kerngebiets, wurde durch die Kartierungsstudie eine höhere Anzahl an APJ-positiven Zellkörpern und Fasern detektiert. In der Literatur findet sich zur Expression des Rezeptors in dieser Region trotz zahlreicher Zitate durch viele Autoren bisher keine Originalpublikation. Apelinprotein hingegen konnte mit einer sehr hohen Expression in dieser Region detektiert werden (Reaux et al., 2002). In der primären, neuroglialen Zellkultur des ARC konnten ebenfalls zahlreiche für APJ immunmarkierte Zellkörper neuronaler Zellen, detektiert werden. Dies bestätigt einerseits den durch die immunhistochemischen Markierung im Gehirnschnitt gewonnenen Eindruck einer ausgeprägten APJ-Rezeptor Expression für den ARC. Andererseits deutet es auch darauf hin, dass kultivierte ARC-Neurone *in vitro* ihre Charakteristik

hinsichtlich des apelinergen Systems beibehalten. Wie für den SON und PVN werden mögliche funktionelle Aspekte der Rezeptor Expression im *Nucleus arcuatus* zusammen bei der Diskussion der Co-Expression mit nNOS erläutert.

Als weitere hypothalamische Gebiete mit hoher APJ-Faserdichte konnte der *Nucleus dorsomedialis hypothalami* mit seinen dorsalen (DMD) und zentralen Komponenten (DMC), die retrochiasmatische Zone (Rch), der *Nucleus praeopticus ventromedialis* und der *Nucleus periventricularis anteroventralis* ermittelt werden. Für keinen dieser Nuclei und Regionen wurde bisher in der Literatur eine Expression des APJ-Rezeptors beschrieben. Hingegen existieren zu allen Regionen Studien zur Expression von Preproapelin-spezifischer mRNA oder des Oligopeptids *per se* (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2002), welche außer für die retrochiasmatische Zone mit der in der Kartierungsstudie beobachteten Verteilung der APJ-Faserstrukturen übereinstimmt Reaux et al. (2002). Der *N. dorsomedialis* hat reziproke Konnektivitäten vor allem zum BNST, dem ventralen Septum, dem PAG, ARC, PVN und weiteren wichtigen Kerngebieten des Hypothalamus (ter Horst und Luiten, 1986; Thompson et al., 1996). Er spielt zum einen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Körpergewichts und des Energiehaushaltes. So führten Läsionen im Bereich dieses Nucleus bei Ratten beiderlei Geschlechts zu Hypophagie und reduziertem linearem Wachstum (siehe Review: Bellinger und Bernardis, 2002). Weiterhin ist der dorsomediale Hypothalamus (DMH) welcher unter anderem den DMD und den DMC enthält, ein wichtiges Gebiet zur Kontrolle kardiovaskulärer Parameter unter emotionalen Stressbedingungen. Zusätzlich dazu ist der DMH eine bedeutende Region zur Kontrolle der Thermogenese vor allem durch zitterfreie Wärmebildung (NST) im intrascapularen braunen Fettgewebe (IBAT). Das konnte unter anderem sowohl durch elektrische Stimulationen der Region als auch Mikroinjektionen des GABA_A-Antagonisten Bisculline methiodide, welche zu einer deutlichen Erhöhung der IBAT- und Körperkern-Temperatur führten, gezeigt werden (Freeman und Wellman, 1987; Zaretskaia et al., 2002).

Möglicherweise zeigt sich deshalb das apelinerge System auch aufgrund der Expression des Apelin-Rezeptors im DMD und DMC an der Regulation dieser Funktionen beteiligt. Für einen Einfluss des apelinergen Systems auf die NST spricht auch die Hochregulation der mRNA des *uncoupling proteins 1* (UCP1) nach chronischer, obwohl peripherer Apelinbehandlung (Higuchi 2007). Auch eine Beteiligung von Apelin/APJ an der Regulation der Energiehomöostase konnte bereits gezeigt werden. (siehe Einleitung) Zahlreiche

Experimente konnten bisher bereits bei zentraler Applikation eine apelinerge Beeinflussung der HPA-Achse und kardiovaskulärer Parameter zeigen (siehe Einleitung).

Auch der *Nucleus praeopticus medianus* (MnPO) zeigte bei der Rezeptorkartierung ausgeprägte immunreaktive Faserstrukturen. Die Expression des APJ-Rezeptors wurde im MnPO ebenfalls bisher nicht beschrieben, jedoch konnte dort wie bei den zuvor genannten Strukturen sein Ligand, allerdings in niedriger Konzentration, als mRNA und per Immunreaktivität detektiert werden (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2002). Die funktionelle Bedeutung der Rezeptorexpression im MnPO wird ebenfalls anhand der Co-Expression mit nNOS diskutiert (siehe Kap. II.3).

Für die circumventrikulären Organen (CVOs) konnte nur im *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und in der *Zona interna* der *Eminentia mediana* (ME) eine ausgeprägte APJ-Immunreaktivität in Nervenfasern und Punctata festgestellt werden. Weiteren CVOs wie die Area Postrema (AP) oder das *Organum subfornicale* (SFO) zeigten keine bis sehr wenig APJ-IR. Wie auch für die meisten der bisher diskutierten Strukturen wurde bislang eine Expression des Apelinrezeptors in den CVOs noch nicht in der Fachliteratur beschrieben, mit Ausnahme des SFOs. Bei ihm wurde der APJ-Rezeptor anhand von Transkriptomanalysen auf mRNA-Ebene nachgewiesen, und es konnte ebenfalls eine durch Dehydrierung induzierte Herunterregulierung der APJ-spezifischen mRNA gezeigt werden (Hindmarch et al., 2008). Im Gegensatz zur Expression des Rezeptors wurde eine Expression von Apelin in allen CVOs mit starker Ausprägung in Faserstrukturen der AP und des SFOs, sowie etwas schwächer im OVLT beschrieben (Reaux et al., 2002). In der gleichen Studie wurde eine hohe Konzentrierung an apelinergen Faserstrukturen in der *Zona interna* der *Eminentia mediana* berichtet. Auch andere Veröffentlichungen zeigten eine Expression des Peptids in der ME (Brailoiu et al., 2002; De Mota et al., 2004). Brailoiu et al. (2002) zeigten dabei Apelin36-immunpositive Axone, welche von offensichtlich magnozellulären Neuronen des PVN und SON zur ME projizierten und durch das Infundibulum der Neurohypophyse im Hypophysenvorderlappen endeten. De Mota et al. (2004) konnten darüber hinaus für diese Projektionen aus dem SON und PVN eine Co-Lokalisation von Apelin mit AVP in der *Zona interna* der *Eminentia mediana* zeigen. Somit deckt sich bei den CVOs die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Expression von APJ mit der in der Literatur beschriebenen Verteilung von Apelin nur in der *Eminentia mediana* und dem OVLT. Mögliche funktionale Aspekte der

Expression des Apelinrezeptors in diesen beiden Strukturen werden ebenfalls bei der Diskussion der Co-Lokalisation mit nNOS näher analysiert (*siehe Kap. II.3*).

Neben den beschriebenen Regionen und Nuclei des Vorderhirns, Thalamus und Hypothalamus konnte in dieser Arbeit zusätzlich eine starke Immunreaktivität für APJ im posterior-dorsalen Teil des *Nucleus medialis amygdali* ermittelt werden. Übereinstimmend damit wurde auf mRNA-Ebene ebenfalls über eine Expression des Rezeptors in der Amygdala berichtet (Medhurst et al., 2003). Die gleiche Studie gab für Preproapelin-spezifische mRNA in der Amygdala eine der höchsten Konzentrationen im ZNS an. Weitere Publikationen zeigten ebenfalls in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit dargestellten APJ Expression das Vorkommen Preproapelin-spezifischer mRNA und auch des Peptides selbst speziell in diesem Subnucleus der Amygdala (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2002). Die Amygdala gilt heute als strukturell und funktionell heterogene Region (Swanson und Petrovich, 1998; Swanson, 2003) und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Emotionen sowie als „emotionales Gedächtnis“. Sie weist zahlreiche Afferenzen und Efferenzen von und zu den verschiedensten Teilen des Gehirns auf. Dazu zählt unter anderem der Input von visuellen, auditorischen und somatosensorischen Informationen aber auch Efferenzen zum PVN. Der *N. medialis amygdali* hat unter anderem eine direkte Afferenz vom akzessorischen olfaktorischen Riechkolben (Scalia und Winans, 1975), und formt zusammen mit anderen Substrukturen der Amygdala den Kern des vomeronasalen Sensor-Motor Systems zur Verarbeitung von pheromonalen Stimuli (Swanson und Petrovich, 1998). Aufgrund der Expression des Apelinrezeptors in diesem Nucleus ist das apelinerge System möglicherweise mit der Regulation von sexuellem Verhalten verknüpft. Dafür spricht auch die beobachtete ausgeprägte Expression von APJ in Nuclei des BNST (*siehe Erg. Kap. II.4.1*), welcher unter anderem ebenfalls bei der Regulation von sexuellem Verhalten und auch der Sekretion von Gonadotropinen eine Rolle spielt (Allen und Gorski, 1990; Hines et al., 1992).

Im *Plexus choroideus* (chp) wurde in der APJ-Kartierungsstudie nur wenig APJ-spezifische Immunreaktivität detektiert. In der Literatur gibt es dazu gegensätzliche Angaben. O'Carroll et al. (2000) konnten in dieser Struktur ebenfalls keine APJ-mRNA detektieren. Im Gegensatz dazu gaben Lee et al. (2000) eine besonders starke Expression der APJ-mRNA im chp an. Die Ependymzellen des chp sekretieren die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und sind für seine Zusammensetzung verantwortlich. Die CSF hat zahlreiche Funktionen wie den Schutz des ZNS, Kommunikation und Transportfunktion von Nährstoffen und metabolischen

Abbauprodukten. Aufgrund der in der Kartierungsstudie nur als sehr gering detektierten Immunreaktivität des Rezeptors im chp lässt sich keiner oder zumindest kein direkter Einfluss des apelinergen Systems in der Regulation der Aufgaben des chp vermuten. Diese These wird durch die Studie von O'Carroll et al. (2000) unterstützt, die ebenfalls keine Expression des Rezeptors als mRNA detektieren konnte. Im Gegensatz dazu konnten jedoch Lee et al. (2000) eine besonders starke Expression von APJ-mRNA im chp beobachten. Aufgrund dieser gegensätzlichen und spärlichen Aussagen sind deshalb noch weitere Studien nötig, um eine definitive Aussage über die Beteiligung des apelinergen Systems an den homöostatischen Funktionen des chp treffen zu können.

Detaillierte Angaben zur Verteilung des APJ-Rezeptorproteins im ZNS der Ratte waren bisher nicht vorhanden und beschränkten sich hauptsächlich auf mRNA-Daten. Falls diese vorhanden waren, wurden sie mit den in der Kartierung gewonnenen Daten verglichen. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Kartierungsstudie mit der wesentlich detaillierter vorliegenden Beschreibung der Expression des Apelins verglichen. In den meisten der in der Rezeptorkartierung beschriebenen Regionen mit stärkerer APJ-Expression konnte eine Übereinstimmung mit Expressionsdaten entweder zu APJ oder Apelin aus der Literatur erzielt werden. Im Gegensatz dazu war in einigen der Regionen bisher keines der beiden Proteine beschrieben und wurde somit durch die Detektion in der vorliegenden Arbeit erstmalig nachgewiesen.

2. Histologische und funktionale Aspekte zur Expression von APJ und Apelin in der Hypophyse

Im Zwischenlappen der Hypophyse konnte ein positive IR für APJ sowie Apelin13 in zahlreichen Zellen im Vorderlappen der Hypophyse dagegen für einzelne Zellen demonstriert werden. In der Literatur existieren bezüglich des immunhistochemischen Apelin-Nachweises in den Substrukturen der Hypophyse unterschiedliche Aussagen. So wurde hinsichtlich der Detektion von Apelin36 über starke Signale im anterioren und sogar posterioren Teil der Hypophyse (= HVL u. HHL) berichtet (Brailoiu et al., 2002). Im Zusammenhang mit der Co-Lokalisation mit klassischen Hypophysenhormonen wurde eine Lokalisation von Apelin17 im anterioren und intermediären Teil der Hypophyse ermittelt (Reaux-Le Goazigo A. et al.,

2007). Ähnlich wie für viele der Substrukturen und Nuclei im Hypothalamus beziehen sich alle bis dato veröffentlichten Angaben zur Expression des APJ-Rezeptors in der Hypophyse ebenfalls lediglich auf Studien seiner mRNA-Expression (Hosoya et al., 2000; Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; De Mota et al., 2000; Medhurst et al., 2003). Widersprüchliche Aussagen existieren jedoch bezüglich der einzelnen Substrukturen. So berichtete De Mota et al. (2000) von einer intensiven Markierung des HZLs und HHLs. O'Carroll et al. (2000) hingegen zeigten einzelne APJ mRNA-positive Zellen im Hinterlappen, konnten jedoch keine Markierung im Zwischen- und Vorderlappen detektieren. Mögliche Unterschiede in den beiden Studien könnten dabei durch die Verwendung unterschiedlicher Rattenstämme und Antisense-Proben zur Detektion der Rezeptor mRNA durch *in situ* Hybridisierung bedingt sein. Die Detektion im Zwischenlappen der Hypophyse (De Mota et al. 2000) bestätigt die in der vorliegenden Arbeit eruierte Proteinexpression in dieser Substruktur. Warum jedoch beide Studien eine Expression von mRNA im Hinterlappen im Gegensatz zu der in dieser Arbeit beobachteten Expression des Proteins im Vorder- und vor allem Zwischenlappen detektierten, bleibt ungeklärt. Die Expression von APJ im Vorderlappen stimmt andererseits mit der von Brailoiu et al. (2002) berichteten Expression von Apelin36 überein.

Aufgrund der Expression sowohl von Apelin als auch seinem Rezeptors in der Hypophyse (HVL und HZL) lässt sich ein Einfluss auf die Freisetzung von Hypophysenhormonen vermuten. Dafür spricht auch die anhand von *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie ermittelte hohe Expression von APJ mRNA in corticotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2007). Weiterhin konnte durch die Applikation von Apelin17 an einem *ex vivo* Perifussionssystem von isolierten Hypophysenhinterlappen die ACTH-Freisetzung signifikant um 41 % erhöht werden. Diese Versuche deuten auf eine bereits durch O'Carroll AM. et al. (2003) vorgeschlagene Beteiligung des apelinergen Systems an der Regulation der HPA-Achse hin.

3. Mögliche Interaktion zwischen Apelin/APJ und NO im ZNS

Die Co-Expression von APJ und nNOS wurde vorrangig für die circumventrikulären Organe (CVOs) sowie für die Kerngebiete des PVN, SON, MnPO und ARC untersucht, neuroglialen Strukturen mit herausragender Bedeutung für die hypothalamische Kontrolle wichtiger

homöostatischer Systeme zur Konstanthaltung von Wasser-/Elektrolyt- und Energiehaushalt und Körpertemperatur. Die CVOs sind Strukturen, die in oder an den Wänden des dritten und vierten Ventrikels liegen und oft auch in das Lumen derselben hineinragen. Als einzige Strukturen im Gehirn weisen sie das Charakteristikum einer nicht geschlossenen Blut-Hirn-Schranke und können deshalb unter anderem als Sensoren für diverse Signalmoleküle im Blut fungieren. Weiterhin werden sie je nach Funktion in sensorische (OVLT, SFO, AP) und neuro-sekretorische (OVLT, ME, HHL, Pinealorgan) CVOs unterteilt (Johnson und Gross, 1993; McKinley et al., 1998; Simon, 2000; Cottrell und Ferguson, 2004; Roth et al., 2004; Wuchert et al., 2008; Wuchert et al., 2009). In den CVOs konnte nur im *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und der *Eminentia mediana* (ME) eine ausgeprägte Immunreaktivität bei den immunhistochemischen Markierungen für APJ beobachtet werden.

In der ME, einem neuro-sekretorischen CVO mit herausragender Bedeutung für die hypothalamische Kontrolle des HVLs, wurden in der Kartierungs- und Co-Lokalisationsstudie mit der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) eine ausgeprägte Co-Distribution APJ- und nNOS-immunreaktiver Faserstrukturen und nNOS-IR vornehmlich in der *Zona interna*, hingegen für Apelin13 in der *Zona externa* detektiert (*siehe Erg. Kap. II.4.1*). Die Immunreaktivität für nNOS in der *Zona interna* der ME deckt sich mit Angaben aus der Literatur (Alm et al., 1997) und entsprechenden Markierungen für NADPH-Diaphorase (NADPH-d) (Ceccatelli et al., 1992; Rodrigo et al., 1994), einem Marker für die Aktivität des Enzyms.

Die *Eminentia mediana* wird häufig als Schnittstelle zwischen Hypothalamus und Hypophysenvorder- und -hinterlappen beschrieben und nimmt eine wichtige Rolle im Rahmen der hypothalamischen Neurosekretion und damit unter anderem der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse (HPA-Achse) ein. So konnte schon früh eine Co-Lokalisation von CRF und Vasopressin in der ME gezeigt werden (Whitnall et al., 1985). Auch Stickstoffmonoxid (NO) scheint an der Regulation der HPA-Achse beteiligt. Darauf deutet eine Co-Expression von Vasopressin-IR und nNOS-IR in der *Zona interna* der ME (Alm et al., 1997) und eine tonisch negative Kontrolle von NO auf die Basalaktivität der HPA-Achse hin (Givalois et al., 2002). Zusätzlich konnte unter anderem eine NO-vermittelte Modulation des Antwortverhaltens der HPA-Achse auf exogen appliziertes Vasopressin gezeigt werden (Rivier und Shen, 1994). Auch für das aplinerge System konnte eine Involvierung in der Steuerung der HPA-Achse, wie schon zuvor diskutiert, gezeigt werden. Aufgrund der Co-Expression von APJ und nNOS in der *Zona interna* der ME, in der sich unter anderem Axone derjenigen Neurone befinden, welche in den neuronalen Teil der

Hypophyse projizieren, könnten möglicherweise beide Systeme drüber hinaus bei der Modulation der Freisetzung von Hormonen aus dem HVL interagieren. Die *Zona externa* der ME hingegen, in welcher Apelin13-IR nachgewiesen werden konnte, enthält hauptsächlich neuroendokrine Nervenendigungen welche ihre peptidergen bzw. katecholaminergen Neurotransmitter (= *releasing/inhibiting factors*) in das Pfortadersystem der Hypophyse freisetzen. Möglicherweise kommt es aus diesen Nervenendigungen ebenfalls zur Freisetzung von Apelin, welches dann vermittelt über die im Vorderlappen der Hypophyse beobachteten APJ-positiven Zellen die Freisetzung klassischer Vorderlappenhormone wie ACTH regulieren könnte. Ein direkter Einfluss von Apelin17 auf die Sekretion von ACTH konnte bereits anhand der Stimulation mit Apelin17 *ex vivo* gezeigt werden (Reaux-Le Goazigo et al. 2007).

Im *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLt) konnte ebenfalls eine ausgeprägte Co-Expression von APJ und nNOS beobachtet werden. Die Expression von nNOS in kleinzelligen Neuronen konnte im OVLt bereits immunhistochemisch nachgewiesen werden (Jurzak et al., 1994) und deckt sich somit mit der ermittelten Markierung für nNOS der vorliegenden Arbeit. Das OVLt gehört zu den sensorischen CVOs, weist efferente Projektionen unter anderem zum MnPO, PVN, ARC und zum magnozellulären, neurosekretorischen SON (Saper und Levisohn, 1983; Camacho und Phillips, 1987) auf und ist somit an der neuronalen Kontrolle der Homöostase der extrazellulären Körperflüssigkeit beteiligt (Honda et al., 1987; Thrasher und Keil, 1987; McKinley et al., 1989; Oldfield et al., 1994; Simon, 2000). Dies konnte für NO anhand seiner modulierenden Funktion auf die Sekretion von Vasopressin und Oxytocin ebenfalls gezeigt werden (Kadekaro und Summy-Long, 2000). NO könnte dabei im Bereich des OVLt eine Rolle spielen, da Dehydrierung bei Ratten unter anderem zu einer erhöhten Expression von NADPH-Diaphorase Aktivität in Neuronen des OVLts führte (Ciriello et al., 1996). Auch das apelinerge System wurde aufgrund seiner Expression in den CVOs, dem PVN und SON und der Hypophyse mit der Kontrolle der Homöostase der Körperflüssigkeit in Verbindung gebracht (De Mota et al., 2000; Reaux et al., 2001; Brailoiu et al., 2002; Reaux et al., 2002; O'Carroll et al., 2003; Tobin et al., 2008). Weiterhin konnte ein funktionaler Zusammenhang zum Renin-Angiotensin-System und zur Freisetzung von Vasopressin, unter anderem ebenfalls wichtige Faktoren bei der Regulation der Wasserhomöostase, gezeigt werden (Vickers et al., 2002; De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo A. et al., 2004).

Aufgrund der Co-Expression von APJ und nNOS im OVLT und der Beteiligung beider Systeme an der Homöostase des Flüssigkeitshaushaltes scheint somit auch eine direkte Interaktion der beiden in den nNOS-positiven Neuronen des OVLT plausibel. Um dies genauer zu untersuchen müssten entsprechende *in vivo* Versuche mit NO-Donoren/-Inhibitoren und Apelin durchgeführt werden.

Im PVN und SON wurde in der vorliegenden Arbeit ein hoher Grad an Co-Lokalisation und Co-Distribution von nNOS und APJ in Nervenzellen, Axonen, Dendriten und Punctata ermittelt. Eine ausgeprägte Expression von NOS in diesen Strukturen wurde bereits zuvor durch NADPH-Diaphorase und immunhistochemische Markierungen gezeigt (Bredt et al., 1990; Vincent und Kimura, 1992). Die APJ-Immunreaktivität im PVN war gerade in dessen magnozellerärer Komponente (PaLM) am deutlichsten ausgeprägt, und so zeigten im PaLM und im SON 50-60% aller APJ-immunpositiven Zellen eine zelluläre Co-Expression mit nNOS. Dies ist gleichbedeutend mit einer ausgeprägten apelinergen Innervation magnozellerärer PVN und SON Neurone. Ebenfalls anhand von NADPH-Diaphorase Markierungen konnte eine Co-Expression von NOS mit Vasopressin und Oxytocin im magnozellerären Bereich des PVN und des SON gezeigt werden (Sanchez et al., 1994). Auch für Apelin konnte eine Co-Expression mit Oxytocin (Brailoiu et al., 2002; Bodineau et al., 2011) und Vasopressin (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2004) in Neuronen des SON und PVN nachgewiesen werden.

Die Expression von nNOS auf Protein- und mRNA-Ebene bzw. der Nachweis NADPH-spezifischer Enzymaktivität zeigte sich unter verschiedenen experimentellen Bedingungen mit vermuteter Sekretion von Vasopressin bzw. Oxytocin in die Blutbahn als erhöht. Dazu zählten unter anderem osmotische Stimulationen (Villar et al., 1994; Srisawat et al., 2004) und die Stimulation durch Schmerz- und Stressreize (Hatakeyama et al., 1996; Kurose et al., 2001; Orlando et al., 2007). Trinkwasserentzug bei Ratten für 24 Stunden resultierte in einer signifikant erhöhten Bindung von tritiiertem N^G-nitro-L-Arginin an funktionelle nNOS Moleküle vor allem des magnozellerären PVN sowie SON (Gerstberger et al., 2001). Im Gegensatz dazu scheint bei osmotischer Stimulierung NO eher inhibitorisch auf die Freisetzung von Oxytocin zu wirken, um dadurch möglicherweise die Ausschüttung von Vasopressin zu begünstigen (Kadekaro, 2004; Ventura et al., 2005). Anhand von nNOS-defizienten Mäusen wurde schließlich ein inhibitorischer Einfluss von NO auf die Genexpression von Vasopressin unter akuten Stressbedingungen postuliert (Orlando et al.,

2007). Auch für Apelin konnte, bei zentraler Applikation in den Liquorraum laktierender Ratten, anhand der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors FOS eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität magnozeller Oxytocin-Neurone nachgewiesen werden (Bodineau et al., 2011). Apelin spielt vermutlich als Gegenspieler von Vasopressin eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wasserhaushaltes. So führte die i.c.v. Injektion von Apelin zur Inhibierung der Freisetzung von Vasopressin ins Plasma (De Mota et al., 2004). Weiterhin zeigte sich nach Dehydrierung die Anzahl und Intensität der Markierung von Apelin-immunreaktiven im Gegensatz zu entsprechend Vasopressin-immunpositiven Zellen im SON und PVN erhöht. (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2004). Dieser Effekt zeigte sich Vasopressin-abhängig, da er durch einen selektiven Vasopressin-1 Rezeptorantagonisten deutlich reduziert werden konnte. Zusätzlich konnte eine diuretische Funktion von zentral appliziertem Apelin nachgewiesen werden (De Mota et al., 2004; Hus-Citharel et al., 2008). Beim Menschen zeigte sich eine reziproke Regulation der Plasmakonzentration von Apelin13 und Vasopressin bei unterschiedlichen osmotischen Stimuli (Azizi et al., 2008).

NO und Apelin zeigen sehr ähnliche Effekte in Bezug auf die Regulation von Vasopressin und Oxytocin. Deshalb und aufgrund ihrer Co-Expression im SON und PVN scheint eine Interaktion bei der Freisetzung der beiden Hormone wahrscheinlich. Um diese These zu untersuchen, müssten die bisher durchgeführten Experimente zur Regulation von Vasopressin und Oxytocin durch Apelin zusätzlich mit einem NO-Inhibitor durchgeführt oder die entsprechenden Effekte in nNOS k.o. Mäusen untersucht werden.

Wie schon zuvor erwähnt, wurde aufgrund der Expression des apelinergen Systems in SON und PVN neben einer Co-Expression mit Vasopressin (AVP) und Oxytocin auch eine mögliche Co-Lokalisation mit dem Corticotropin-releasing-factor (CRF), sowie auch aufgrund der Expression in der Hypophyse eine Beteiligung an der Regulation der HPA-Achse vermutet (O'Carroll et al., 2000). Tatsächlich führte die Verabreichung von i.c.v. Apelin13 (10 nmol) unter anderem zu einem erhöhten ACTH- und Corticosteron-Plasmaspiegel (Taheri et al., 2002). Zusätzlich erhöhte die i.c.v. Verabreichung von PyrAp13 (1 mg/kg) bei Mäusen die Konzentration von hypophysärem Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) und adrenalem Corticosteron (CORT) im Plasma signifikant (Newson et al., 2009). Dieser Effekt konnte sowohl bei gleichzeitiger Gabe eines CRF-Rezeptor-Antagonisten und als auch in AVP V1b-Rezeptor knock out Mäusen signifikant reduziert werden. Dies spricht dafür, dass die apelinergen Effekte auf die HPA-Achse sowohl durch CRF als auch durch AVP vermittelt werden. Auch für NO konnte *in vitro* an hypothalamischen Explantaten eine modulierende

Funktion der KCl-bedingten CRF-Freisetzung gezeigt werden (Costa et al., 1993). Möglicherweise interagieren NO und das apelinerge System deshalb bei der Freisetzung von ACTH und CRF.

Weitere Studien zur Funktion von NO im PVN konnten zeigen, dass die Mikroapplikation von Natriumnitroprussid, als NO-Donor direkt in den PVN zu einem Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks bei anästhesierten Ratten führte (Horn et al., 1994). Im Gegensatz dazu bedingte die entsprechende Applikation eines NO-Inhibitors unter anderem zu einem Anstieg von arteriellem Blutdruck und Herzfrequenz (Zhang et al., 1997). NO im PVN zeigt somit auch einen inhibitorischen Effekt auf kardiovaskuläre Parameter. Im Gegensatz dazu führte die i.c.v. Applikation von Apelin dosisabhängig zu einer Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz (Kagiyama et al., 2005). Möglicherweise agieren deshalb NO und das apelinerge System bei PVN-vermittelten kardiovaskulären Parametern als Gegenspieler.

Der *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) spielt wie das OVLT, unter anderem eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Flüssigkeitshomöostase des Körpers. So führten zum Beispiel Läsionen in der anteroventralen Region des dritten Ventrikels, welche u.a. den ventralen Teil des MnPO umfasst, bei Ratten, Schafen und Hunden zu permanenter oder temporärer Adipsie (Anderson und McCann, 1956; Lind und Johnson, 1983; Marson et al., 1985; McKinley et al., 1999). Die Kontrolle der Flüssigkeitshomöostase durch den MnPO scheint dabei unter anderem ebenfalls NO-vermittelt. So führten Mikroinjektionen des NO-Inhibitors L-NAME in den MnPO von Ratten unter anderem zu einer erhöhten Salz- und Wasseraufnahme und zu einer Erhöhung von Salz- und Urinexkretion (da Silva et al., 1995). Bei weiblichen APJ k.o. Mäusen resultierte der Entzug des Trinkwassers und eine erhöhte Salzlast zu einer gegenüber den Wildtyptieren erniedrigten Expression von c-Fos-spezifischer mRNA im MnPO (Roberts et al., 2010). In den gleichen Experimenten führte die Salzlast bei den k.o. Mäusen zu einer verstärkten renalen Diurese und Reduktion des Plasmavasopressinspiegels sowie der Transkription von Vasopressin-mRNA im SON und PVN. Bei Trinkwasserentzug hingegen konnten sie das Volumen ihres Urins nicht wie die Kontrolltiere reduzieren. Diese Studie deutet zusammen mit den Co-Expressionsstudien und der Beeinflussung der Freisetzung von Vasopressin auf eine zentrale Rolle des apelinergen Systems in der Regulation des Wasserhaushaltes hin. Die Co-Expression von APJ und nNOS in den magnozellulären Neuronen des PVN und SON sowie die Co-Expression von APJ und

nNOS in Faserstrukturen des MnPO könnte dabei eine Involvierung von NO in der apelinergen Regulation des Wasserhaushaltes ermöglichen.

Des weiteren wurde der MnPO, wie schon in der Einleitung dargestellt, mit der Regulation der Körpertemperatur in Verbindung gebracht (Gerstberger, 1999; Gerstberger et al., 2001). So konnte anhand von elektrophysiologischen Einzelzellableitungen an Gewebeschnitten eine Sensitivität einzelner Neurone sowohl für Temperaturänderungen und Änderungen der Osmolalität festgestellt werden (Travis und Johnson, 1993). Weiterhin führte eine Wärmeexposition bei Ratten zu erhöhter FOS-Expression im MnPO (Maruyama et al., 2003). Die Kombination aus osmotischem Reiz und Temperaturstimulation bedingte einen additiven Effekt hinsichtlich der FOS-Expression in allen Substrukturen des MnPO der Ratte (Patronas et al., 1998). Auch NO spielt bei der Regulation der Körpertemperatur eine wichtige Rolle. Jedoch hatte die Applikation von NO-Inhibitoren je nach Injektionsort und Versuchsansatz bei normothermen Tieren einen hypo- oder hyperthermischen Effekt (De Luca B. et al., 1995; Scammell et al., 1996; Mathai et al., 1997).

Auch für das apelinerge System konnte ein Einfluss auf die Körpertemperatur gezeigt werden. So zeigten transgene Mäuse, die das menschliche Apelin überexprimierten, eine erhöhte Rektaltemperatur (Yamamoto et al., 2011). Die chronische zentrale und periphere Applikation von Apelin erzeugte bei Mäusen unter anderem ebenfalls einen Anstieg der Rektal- bzw. Körperkerntemperatur (Higuchi et al., 2007b; Valle et al., 2008), wobei Valle et al. (2008) diesen Effekt jedoch hauptsächlich auf eine gesteigerte Aktivität zurückführten. Im Gegensatz dazu konnten (Jaszberenyi et al., 2004) durch die zentrale Applikation (i.c.v.) von Apelin13 zwar ebenfalls eine Erhöhung der Körpertemperatur feststellen, jedoch hatte die Applikation keinen Einfluss auf die „*exploratory activity*“. Die gleichzeitige Behandlung mit L-NAME, einem unspezifischen Inhibitor der NO-Synthasen hatte dabei jedoch keinen Einfluss auf die durch Apelin bedingte Steigerung der Körpertemperatur. Die bei einer i.c.v. Injektion applizierte Substanz könnte per Diffusion aufgrund seiner Lage am dritten Ventrikel durchaus den MnPO erreicht haben. Aufgrund dessen scheint eine Beteiligung von NO aus dieser Region an den apelinergen Effekten auf die Körpertemperatur unwahrscheinlich. Dies schließt jedoch eine Beteiligung von NO in durch die Diffusion des Inhibitors nicht erreichte Regionen nicht aus.

Der *Nucleus arcuatus* (ARC) spielt im Hypothalamus vor allem eine wichtige Schlüsselrolle in der Energiehomöostase (siehe Review Morton et al., 2006). Dabei scheint auch NO

involviert zu sein. So konnte gezeigt werden, dass der kurzlebige, gasförmige Neuro-modulator NO unter anderem durch das Orexigen Ghrelin aktivierte Zellen des ARC bei Ratten in ihrer Aktivität hemmt (Riediger et al., 2006). Weiterhin führte das Adipokin Leptin bei Mäusen zu einer Phosphorylierung von nNOS in Neuronen des ARC (Donato et al., 2010), und sowohl nNOS als auch die endotheliale Form (eNOS) des Enzyms zeigten sich an der Regulation der Glucosehomöostase beteiligt (Cabou et al., 2007; Fioramonti et al., 2010). Die intracerebroventrikuläre Applikation von Apelin13 (100 pmol/l) führte bei Mäusen ohne Änderung des Insulinspiegels zu einer signifikanten Abnahme der Glucosekonzentration im Plasma und einer verbesserten Glucoseaufnahme in einem oralen Glucosetoleranztest (Duparc et al., 2011). Durch die pharmakologische Blockade der NOS mit dem unspezifischen Inhibitor L-NMMA und in eNOS k.o. Mäusen traten diese Effekte nicht auf. Weiterhin zeigte eine aktuelle Studie die Expression von APJ-spezifischer mRNA in Proopiomelanocortin (POMC)-, nicht aber in Neuropeptid Y (NPY)-Neuronen des ARC (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2011). Dies konnte anhand von im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunocytochemischen Doppelmarkierungen für APJ und NPY in neuroglialen *N. arcuatus* Kulturen auch auf Proteinebene bestätigt werden. Reaux-Le Goazigo et al. (2011) konnte außerdem zeigen, dass Apelin17 *in vitro* die Freisetzung von α -Melanozyten stimulierendem Hormon (α -MSH) in Gewebe aus dem ventralen Hypothalamus stimulierte. Die Expression des APJ-Rezeptors im ARC und auch in anderen für die Energiehomöostase wichtigen Gebieten, wie dem *Nucleus ventromedialis* und *Nucleus dorsomedialis* des Hypothalamus (VMH/DMH), lassen zusammen mit den zuvor angeführten Experimenten auf eine Beteiligung des apelinergen neuromodulatorischen Systems an diesem autonom funktionalen Regelkreis schließen. Aufgrund der Co-Expression von nNOS und möglicherweise auch anderen Formen der NOS mit APJ, vor allem im ARC, scheint dabei eine Interaktion von NO und dem apelinergen System ebenfalls möglich.

Der Apelin-Rezeptor APJ konnte in der vorliegenden Arbeit in Zellen der primären HZL-Kultur mit nNOS, *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide38* (PACAP38), Apelin12 und ACTH co-lokalisiert werden. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Antikörperkombinationen zur Detektion von APJ und nNOS ergab hauptsächlich Diskrepanzen bezüglich des Grades der Co-Lokalisation der beiden Markierungen für nNOS (*siehe Abbildung 25*). Für die beiden APJ-spezifischen Antikörper konnte hingegen eine große Übereinstimmung der detektierten Strukturen sowohl in der Zellkultur als auch in histologischen Gewebeschnitten ermittelt werden (*siehe Erg. Kap. II.1.1 und II.1.2*). Dies

bestätigte zusammen mit der anderen Kontrolle (*Erg. Kap. II.1.3*) die Spezifität des Kaninchen-Antikörpers für das APJ-Antigen in der durchgeführten Kartierungsstudie. Bei den beiden nNOS-Antikörpern hingegen zeigte der Maus-Antikörper unter den gewählten Bedingungen schwächere Bindungsaktivität bezüglich des Antigens. Für den nNOS Maus-Antikörper wurden als Immunisierungssequenz die ersten 300 Aminosäuren des menschlichen NOS1 verwendet. Ein Alignment der Sequenzen von Ratte und Mensch (<http://www.uniprot.org/align>) ergab dabei im Bereich der Aminosäuresequenz 140-227 eine Reihe nicht übereinstimmende Aminosäuren bei sonst sehr hoher Homologie der beiden Sequenzen. Möglicherweise erklärt dies die schwächere Bindungsaktivität dieses Antikörpers für nNOS der Ratte.

Der zum Teil hohe Prozentsatz an Co-Lokalisation von nNOS, PACAP38, Apelin und ACTH jeweils mit APJ lässt sich nur über die gleichzeitig Expression von mehreren Markern in einer Zelle erklären. Vermutlich enthalten deshalb APJ-positive Zellen des HZL zusätzlich einen oder zwei weitere der untersuchten Neuropeptide, was eine zelluläre Interaktion der jeweiligen Systeme ermöglichen würde. Um diese Co-Lokalisation zu verifizieren müssten die in dieser Studie gewonnen Erkenntnisse zusätzlich durch eine immunhistochemische Untersuchung abgesichert werden. Für die Zellen der HZL-Kultur wurde eine hohe Co-Lokalisation von APJ mit seinem Liganden Apelin festgestellt. Die Expression von sowohl Rezeptor als auch Apelin im HZL konnte anhand immunhistochemischer Untersuchungen dieser Arbeit festgestellt werden (siehe *Erg. Kap. und II.4.2 und I.2*). Weiterhin wurde die Co-Expression von Rezeptor und Ligand anhand von histologischen Untersuchungen im SON und PVN beschrieben (Reaux et al., 2001) und konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Zusätzlich konnte in weiteren Gehirnstrukturen und hypothalamischen Nuclei ebenfalls eine Co-Expression von Rezeptor und Peptid festgestellt werden. [Für einen Vergleich aller Strukturen mit Expression von Peptid und Rezeptor vergleiche *Tabelle 10* mit (Reaux et al., 2002). Immunhistologische Co-Lokalisationsstudien an den Zellen der verschiedenen Regionen wurden jedoch nicht durchgeführt.

Die ausgeprägte Co-Lokalisation von Rezeptor und Peptid in den primär kultivierten Zellen des HZL könnte auf eine mögliche parakrine oder sogar autokrine Wirkung des Apelins auf den Rezeptor in den Zellen deuten. Aufgrund der Reaktivität des Apelin12-Antikörpers für alle Apeline konnte jedoch keine bestimmte Apelinform in diesen Zellen definiert werden. Möglicherweise könnte es sich deshalb bei den detektierten Signalen auch um mehrere verschiedene Apelinformen handeln. Dies müsste anhand von spezifischen Antikörpern und

entsprechenden immunhistologischen Markierungen überprüft werden. In einem *in vivo* Versuch konnte bisher eine Herunterregulation der hypothalamischen Rezeptor-mRNA-Expression durch die zentrale Applikation von Apelin gezeigt werden (Clarke et al., 2009). Dieser Effekt trat jedoch nur bei diätinduziert fettleibigen Ratten auf. Bei der Co-Expression von APJ und PACAP38 war das Verhältnis aller PACAP-immunreaktiven Zellen zu den Co-Lokalisierten deutlich höher ausgeprägt als das von APJ zu den Zellen mit Doppelmarkierung. Offensichtlich war ein Großteil der PACAP38-IR Zellen auch APJ positiv, jedoch nicht umgekehrt. Dies war möglicherweise, wie in *Abbildung 35A* ersichtlich, durch die höhere absolute Zahl an PACAP38 Zellen in der Kultur bedingt.

Der Hypophysenzwischenlappen (HZL) enthält hauptsächlich melanotrophe Zellen, welche aus der Vorläuferform Proopiomelanocortin (POMC) des POMC-Gens α -Melanozyten stimulierendes Hormon (α -MSH) und β -Endorphin prozessieren und freisetzen (Mains und Eipper, 1979; Jackson und Lowry, 1983; Chang und Loh, 1984). Die beobachtete hohe Co-Expression von APJ und ACTH in der primären HZL-Kultur deutet dabei möglicherweise auf einen Einfluss des apelinergen Systems auf die Prozessierung und Freisetzung von α -MSH und β -Endorphin in diesen Zellen. Aufgrund der geringen Kreuzreaktivitäten des ACTH-Antikörpers für α -MSH und CLIP, wurden vermutlich größtenteils das ACTH selbst oder andere Vorläufermoleküle der α -MSH und/oder β -Endorphin-Prozessierung in diesen Zellen detektiert. An hypothalamischen Explantaten konnte bereits die Freisetzung von α -MSH durch die Stimulation mit Apelin gezeigt werden (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2011).

Anhand der Co-Expression von APJ mit nNOS im HZL könnte möglicherweise das apelinerge System auch auf NO-vermittelte Effekte bezüglich der POMC-Produkte im HZL einwirken. So konnte eine Beeinflussung der POMC-Transkription (Keilhoff et al., 2001) und der Sekretion von Beta-Endorphin durch nNOS beziehungsweise NO im HZL gezeigt werden (Crack et al., 1997). PACAP38 wurde bereits im HZL der Ratte beschrieben (Kimura et al. 1994) und stimuliert ebenfalls in melanotrophen und corticotrophen Zellen die POMC-Expression und die Freisetzung von α -MSH und ACTH (Koch und Lutz-Bucher, 1992; Rene et al., 1996). Zusammenfassend könnte das apelinerge System aufgrund der in dieser HZL-Kultur ermittelten Co-Expressionen deshalb möglicherweise direkt oder indirekt via PACAP38 oder NO Einfluss auf die Sekretion von Produkten des POMC Gens in Melanotrophen nehmen.

III. Untersuchungen apelinerges Signalkaskaden

1. Funktionale Untersuchungen zur Rolle von Apelin/APJ an PVN- und MnPO-spezifischen neuroglialen Primärkulturen mittels Ca^{2+} -Imaging

Um eine mögliche modulatorische Funktion des apelinergen Systems auf nNOS-positive oder entsprechend -negative Zellen des PVN und MnPO zu untersuchen, wurden Ca^{2+} -Imaging-Messungen an PVN- und MnPO-spezifischen Primärkulturen vorgenommen. In anderen Zelltypen (z. B. isolierte Kardiomyozyten der Ratte) konnte bereits eine durch Apelin16 induzierte Erhöhung der Amplitude der elektrisch-stimulierten intrazellulären Calciumkonzentration gezeigt werden (Wang et al., 2008). Der durch Apelin16 ausgelöste, positiv inotrope Effekt erwies sich dabei als unabhängig von L-Typ Calciumkanälen, aber abhängig von Na^+/H^+ - und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern bei erhöhter Aktivität der sarcoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (Szokodi et al., 2002; Wang et al., 2008). Im Gegensatz dazu ergab die Stimulation mit PyrAp13 in der primären neuroglialen PVN- und der MnPO-Kultur der vorliegenden Arbeit für alle getesteten Zelltypen nur eine geringe direkte Responsivität anhand der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Die Gruppe der responsiven Astrozyten des PVN zeigte dabei einen höheren mittleren Anstieg des ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei hoher intrazellulärer Variabilität.

Das geringe Antwortverhalten der untersuchten Zelltypen in der Kulturen könnte zum einen durch die Verwendung einer unterschiedlichen Apelinform, wie in den zuvor beschriebenen Versuchen, bedingt sein. Einige eigene Messungen mit einer längeren Apelinform (Apelin36) deuteten jedoch auf ein ähnlich geringes Antwortverhalten auf dieses Peptid hin. Weiterhin wäre natürlich auch eine Beteiligung anderer intrazellulärer Signalwege nach Apelin-Stimulation in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen denkbar. Falls vorhanden lässt der, verglichen mit einem klassischen exzitatorischen Neurotransmitter wie Glutamat, wesentlich geringer ausgeprägte apelinerg bedingte Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum (Tobin et al., 2008) deshalb auf eine eher modulatorische Wirkung des Apelins auf die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien) der untersuchten Kulturen schließen.

Viele andere Neuropeptide, wie zum Beispiel NPY, Oxytocin und Vasopressin, zeigen eine neuromodulierende Wirkung in dem sie Einfluss auf die Freisetzung von Glutamat und/oder GABA nehmen (Colmers et al., 1988; Kombian et al., 2002; Guo et al., 2002). Für NPY wurde zudem eine Abhängigkeit der modulierenden Funktion von extrazellulären Calcium gezeigt (Colmers et al., 1988). Anhand des Neuropeptids *pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide* (PACAP) konnte eine direkte Modulation des glutamatergen Calciumsignals an Neuronen des *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN), wie in der vorliegenden Arbeit für Neurone und Astrozyten des MnPO und den PVN, nachgewiesen werden (Kopp et al., 2001). Für ihre Versuche benutzen Kopp et al. (2001) die gleichen Konzentrationen an Glutamat und PACAP wie in der vorliegenden Arbeit für Glutamat respektive PyrAp13 verwendet.

Ein möglicher Mechanismus der ermittelten positiven und negativen Modulation der durch Glutamat induzierten Calciumsignale könnte dabei die direkte oder indirekte Einflussnahme von PyrAp13 auf Glutamatrezeptoren sein. Die momentan bekannten Glutamatrezeptortypen werden in ionotrope (NMDA, AMPA/Kainate) und metabotrope (mGluR 1-8) unterteilt. NMDA-Rezeptoren agieren dabei als Ionenkanäle und zeigen bei ihrer Aktivierung eine erhöhte Permeabilität für Calcium (Pumain et al., 1987), während bei Kainat-Rezeptoren die Permeabilität für Calcium, bei hoher Leitfähigkeit für Na^+ und K^+ , eher geringer, jedoch abhängig von der Untereinheit und der Editierung einer bestimmten Stelle des Rezeptors ist (Burnashev et al., 1995; Burnashev et al., 1996). Auch bei den AMPA-Rezeptoren ist die Calciumpermeabilität von der Zusammensetzung der Untereinheiten abhängig (Hollmann et al., 1991; Geiger et al., 1995; Burnashev et al., 1995). Metabotrope Glutamatrezeptoren hingegen bewirken über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, je nach Gruppenzugehörigkeit, die Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Gruppe 1) (Aramori und Nakanishi, 1992; Abe et al., 1992) oder durch die Inhibierung der Adenylatcyclase eine Inhibierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen in der Zellmembran (Gruppe 1+2) (Tanabe et al., 1993; Chavis et al., 1994). Möglicherweise könnten deshalb entsprechend calciumpermeable Glutamatrezeptoren an der Modulation des detektierten apelinergen Effekts beteiligt sein. Aufgrund der geringen Responsivität der Neurone und Astrozyten auf PyrAp13 während der Versuche konnten jedoch keine pharmakologischen Untersuchungen bezüglich der Herkunft des Calciums und der involvierten Glutamat-Rezeptortypen durchgeführt werden.

Für Apelin konnte jedoch bereits in einigen Arbeiten die Beeinflussung von NMDA-Rezeptoren gezeigt werden: (1) Die Applikation verschiedener Apelinformen in kultivierten

hippocampalen Neuronen führte zu neuroprotektiven Effekten in NMDA-Rezeptor-vermittelten Excitotoxinmodellen wie HIV und Quinolinsäure (O'Donnell et al., 2007). (2) Apelin13 konnte in corticalen Neuronen vor Serumdeprivation-induzierter Apoptose schützen und dabei unter anderem die NMDA-vermittelte intrazelluläre Calciumakkumulation vermindern (Zeng et al., 2010). (3) Die neuroprotektiven Effekte von Apelin wurden dabei über Inositoltrisphosphat und Aktivierung der Proteinkinase C, *mitogen-activated protein kinase 1/2*, die *extracellular signal-regulated kinase-1/2* (ERK1/2), sowie die Abschwächung der NMDA-Signalkaskade über eine Modellierung der NR2B Untereinheit vermittelt (Cook et al., 2011). Möglicherweise könnte deshalb die in dieser Arbeit beobachtete Modulation ebenfalls durch NMDA-Rezeptoren vermittelt sein.

In den durchgeführten Versuchen wurden die Zellen einer Glutamat-Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ für 3 min ausgesetzt. Ein möglicherweise durch diesen Stimulus bedingter excitotoxischer Effekt auf einen Großteil der kultivierten Zellen scheint aufgrund der in anderen Studien angegeben EC_{50} -Konzentrationen für neurogliale Kulturen bei einer Exposition von jeweils 5 min mit 50-100 $\mu\text{mol/l}$ (Choi et al., 1987) bzw. 150-200 $\mu\text{mol/l}$ (Hartley et al., 1993), eher unwahrscheinlich. Dies schließt jedoch die mögliche Aktivierung NMDA-vermittelter, excitotoxischer Signalwege einzelner Zellpopulationen durch die verwendete Dosis nicht aus.

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten hohen Co-Expression und Co-Lokalisation von nNOS und APJ im Bereich des PVN und MnPO könnte möglicherweise der Transmitter NO ebenfalls für die durch Apelin-vermittelte Modulation der intrazellulären Calciumkonzentration verantwortlich gewesen sein. So konnte eine S-Nitrosylierung von NMDA-Rezeptoren durch NO und eine damit verbundene Inhibierung gezeigt werden (Chen und Lipton, 2006). Im Gegensatz dazu waren in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zwei von sieben der positiv durch PyrAp13 modulierten Neurone der MnPO-spezifischen Kultur, jedoch keiner der Astrozyten und beider Zelltypen der PVN-Kultur, nNOS-positiv. Aufgrund der geringen n-Zahlen der modulierten Zellen konnte deshalb nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei dieser Population um nitrerge oder nicht-nitrerge Zellen handelte. Neben einer über Apelin vermittelten, nitrergen Beeinflussung von NMDA-Rezeptoren könnte möglicherweise die positive und negative Modulation des glutamatergen Calciumeinstroms, wie bereits für PACAP durch Kopp et al. (2001) gezeigt, auch auf die gleichzeitige Beeinflussung mehrerer unterschiedlicher Glutamaterezeptoren zurückzuführen gewesen sein.

Weiterhin könnte die negative G-Protein Kopplung des APJ-Rezeptors mit einer daraus resultierenden Hemmung der Adenylatcyclase-Aktivität zu einem ähnlichen inhibitorischen Effekt auf spannungsgesteuerte Calciumkanäle führen wie für die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (Gruppe 1+2) beschrieben. Dies könnte als möglicherweise Glutamatrezeptor-unabhängiger Prozess die negative Modulation der intrazellulären Calciumkonzentration erklären. Die beobachtete Modulation in Neuronen und Astrozyten der spezifischen Primärkulturen des PVN und MnPO könnte dabei möglicherweise die zelluläre Grundlage für die beobachteten physiologischen Effekte bei zentraler (i.c.v.) Applikation von PyrAp13 in *in vivo* Versuchen darstellen.

2. Apelin-induzierte ERK 1/2-Phosphorylierung mittels Western Blot Analyse in der primären HZL-Kultur

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen sollte eine Aktivierung der *extracellular regulated kinase (ERK) 1/2* durch Phosphorylierung nach apelinergem Stimulation untersucht werden. Dabei konnte in der primären Kultur des Hypophysenvorderlappens (HVL) gegenüber der Kontrolle eine durch die Behandlung mit PyrAp13 erhöhte Phosphorylierung der ERK2 (p42) demonstriert werden. Ebenso zeigten die als Positivkontrolle verwendeten Kardiomyozyten nach der Behandlung mit Phenylephrin eine Erhöhung der Phosphorylierung der Kinase. Sowohl im HVL als auch bei den Kardiomyozyten war dieser Effekt jedoch nicht signifikant ausgeprägt, was möglicherweise in der geringen n-Zahl von vier beziehungsweise fünf Wells begründet lag.

Im Gegensatz dazu konnte in der primären Kultur des Hypophysenzwischenlappens (HZL) keine durch PyrAp13 induzierte Phosphorylierung der ERK 1/2 oder p44/42 detektiert werden. Auch (Xie et al., 2006) konnten nach Stimulation mit Apelin13 (1 nmol/l) keine Aktivierung der ERK in menschlichen Osteoblasten feststellen. Dabei ist anzumerken, dass sie eine Serumdeprivation der Zellen (48h) vor der eigentlichen Stimulation benutzen. Dies steht im Gegensatz zu Publikationen, welche eine durch Apelin induzierte Phosphorylierung der Kinase in transfizierten Zelllinien oder verschiedenen primär kultivierten Zellen zeigen konnten. So konnten (Bai et al., 2008) mit PyrAp13 bei zur vorliegenden Arbeit identischer

Stimulationszeit und Dosis (10 und 100 nmol/l) in transfizierten HEK-293 Zellen eine deutliche Aktivierung der ERK1/2 zeigen. Generell zeigten die nicht stimulierten Kontrollen des HZL und des HVL eine gegenüber den Kardiomyozytenproben bereits deutlich erhöhte basale Phosphorylierung des Enzyms. Dies könnte möglicherweise durch den 24-stündigen Entzug des Serums bedingt gewesen sein, welcher bei den Kardiomyozyten nicht durchgeführt wurde. Eine Serumdeprivation und damit der Entzug von Wachstumsfaktoren führt in vielen Zelltypen zur Induktion eines apoptotischen Zelltods (Araki et al., 1990; Rawson et al., 1991; Galli und Fratelli, 1993) und wird deshalb auch gezielt zur Untersuchung apoptotischer Signalwege eingesetzt. Bei der Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden kann es auch zur Phosphorylierung von ERK 1/2 kommen (Pirkmajer und Chibalin, 2011). Auch in primär kultivierten Zellen des HVLs führte eine Serumdeprivation von 24 Std. zum Absterben von ca. 40 % der Zellen (Fernandez et al., 2004). Spezielle Untersuchungen zu apoptotischen Effekten des Serumentzugs wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Jedoch konnte bei der optischen Evaluation des Wachstums und der Morphologie der Zellen unter dem Mikroskop kein Unterschied im Vergleich zu nicht deprivierten Zellen festgestellt werden. Dies schließt natürlich die Induktion apoptotischer Signalwege ohne zunächst sichtbare Effekte nicht aus. Möglicherweise konnten deshalb aufgrund einer durch die Serumdeprivation induzierten Phosphorylierung keine apelinergen Effekte auf die Aktivierung des Enzyms mehr detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte für Apelin13 (5 nmol/l) in primären kortikalen Neuronen der Maus auch eine Inhibierung der durch Serumdeprivation induzierten Phosphorylierung von ERK 1/2 gezeigt werden (Zeng et al., 2010). Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit in den primär kultivierten Zellen des HVL und HZL jedoch nicht beobachtet werden. Möglicherweise zeigt Apelin13 seine cytoprotektive Wirkung speziell in neuronalen Zellen. Um diese Hypothese zu überprüfen wären jedoch weitere Studien an unterschiedlichen Zelltypen notwendig.

Aufgrund der zum Teil sehr unterschiedlichen Effekte von Apelin auf die Aktivierung der ERK 1/2, auch im Zusammenhang mit Serumentzug, präsentiert sich ein Vergleich der in der Literatur in verschiedenen Zelltypen beschriebenen Effekte auf die Kinase schwierig. So konnte speziell auch für die Phosphorylierung von ERK 1/2 nach Serumdeprivation eine große Diskrepanz in unterschiedlichen Zelltypen festgestellt werden (Pirkmajer und Chibalin, 2011).

IV. *In vivo* Untersuchungen zur Auswirkung zentraler (i.c.v.) Applikationen von PyrAp13

Um Rückschlüsse auf zentralnervös bedingte physiologische Effekte des Apelins ziehen zu können, wurden die beschriebenen *in vivo* Versuche durchgeführt. Dabei sollte der Einfluss von zentral applizierten PyrAp13 auf LPS-induziertes *sickness behavior*, die Interaktion mit AngII und die Beeinflussung der circadianen Rhythmik der Körpertemperatur, Lokomotion und Futter-/Wasseraufnahme untersucht werden.

Bei der LPS-Studie zeigte PyrAp13 in den Zeiträumen 3-6 und 6-9 Std. nach seiner zentralen Applikation einen deutlichen antipyretischen Effekt auf LPS induziertes Fieber. Für andere Neuropeptide wie α - und γ -Melanozytenstimulierendes Hormon (MSH), ACTH, Galanin, CRF und Vasopressin konnte bei zentraler Applikation ebenfalls in der Ratte, im Kaninchen und Meerschweinschen eine fieberreduzierende Wirkung gezeigt werden (Glyn und Lipton, 1981; Bernardini et al., 1984; Naylor et al., 1985; Cooper et al., 1987; Bock et al., 1994; Lyudyno et al., 2001). Als Review zu diesem Thema siehe (Roth, 2006). Möglicherweise zeigte Apelin dabei selbst endogene, intrinsische antipyretische Eigenschaften oder diese waren über eines der genannten Peptide vermittelt. Für eine Vermittlung durch ACTH spricht, dass durch die zentrale (i.c.v.) Applikation von PyrAp13 ein Anstieg des Plasmagehalts an ACTH und Corticosteron beobachtet werden konnte (Taheri et al., 2002; Newson et al., 2009). Weiterhin konnte anhand der Stimulation mit Apelin17 *ex vivo* ein direkter Einfluss auf die Freisetzung von ACTH aus dem Hypophysenhinterlappen gezeigt werden (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2007).

Eine weitere Möglichkeit könnte die Vermittlung der zentral vermittelten Antipyrese über α -MSH darstellen. So konnte eine Veröffentlichung erst kürzlich eine durch Apelin17 stimulierte Freisetzung von α -MSH aus hypothalamischen Explantaten zeigen (Reaux-Le Goazigo A. et al., 2011). Für eine Vermittlung durch ACTH und/oder α -MSH spricht ebenfalls die Reduktion des LPS-induzierten Plasma TNF- α -Spiegels durch die gleichzeitige Applikation von Apelin in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen. So zeigten andere Arbeiten sowohl bei der peripheren i.v. Applikation von ACTH als auch der zentralen i.c.v. Verabreichung von α -MSH eine Absenkung des Serumspiegels von LPS-induziertem TNF- α (Fantuzzi et al., 1995; Rajora et al., 1997).

Im Gegensatz dazu konnte jedoch auch eine direkte positive Korrelation der Apelin-Expression mit der von TNF- α in menschlichem Fettgewebe und in einer Präadipozytenzelllinie der Maus gezeigt werden (Daviaud et al., 2006). Im Gegensatz dazu führte die Superfusion einer Makrophagenkultur der Maus mit PyrAp13 (10 nmol/l) zu einer reduzierten mRNA Expression für TNF- α , sowie auch zu einem erniedrigten IL-6 Proteinlevel (Leeper et al., 2009). Möglicherweise bewirken deshalb in den Versuchen der vorliegenden Arbeit sowohl zentrale Mechanismen wie die Stimulation der ACTH- und/oder α -MSH-Freisetzung als auch lokale Mechanismen eine Reduktion der LPS-induzierten TNF- α -Freisetzung. Gegen eine lokale Beeinflussung der TNF- α -Konzentration sprechen jedoch die Stimulationsversuche in den primären PVN- und MnPO-Zellkulturen. Bei diesen konnte im Gegensatz zu den *in vivo* Versuchen zwar nach 90 Minuten eine Tendenz, jedoch keine signifikante Abnahme der LPS-induzierten TNF- α Produktion durch Apelin beobachtet werden.

Neben der Reduktion der LPS-induzierten Fieberantwort waren andere typische LPS-induzierte Parameter wie Anorexie, Adipsie und verminderte Lokomotion durch die Verabreichung von PyrAp13 nicht signifikant beeinflusst, obwohl in einem Zeitraum von 24 Std. eine Tendenz zur Abschwächung der Adipsie und Anorexie beobachtet werden konnte. Dies könnte ein peripherer Effekt der Absenkung des LPS-bedingten Anstiegs des TNF- α -Plasmaspiegels sein, da das Cytokin selbst anorektische Eigenschaften besitzt (Plata-Salaman et al., 1988) und bei einer hohen LPS-Dosis mitverantwortlich für die durch LPS-induzierten Krankheitseffekte ist (Tollner et al., 2000).

Die Versuchstiergruppen ohne LPS-Behandlung wiesen untereinander ebenfalls keine signifikante Änderung in Temperatur, Futter- und Wasseraufnahme auf. Jedoch zeigten beide mit Apelin behandelten Versuchsgruppen im Zeitraum von bis zu neun Stunden *post injectionem* eine gegenüber den mit aCSF-applizierten Tieren tendenziell erhöhte Temperatur. Eine erhöhte Körpertemperatur konnte ebenfalls bei einmaliger sowie chronischer zentraler Applikation von Apelin13 bei Ratten und Mäusen festgestellt werden (Jaszberenyi et al., 2004; Higuchi et al., 2007; Valle et al., 2008). In ihrer Studie führten Valle et al. (2008) die erhöhte Körpertemperatur jedoch hauptsächlich auf eine Zunahme der lokomotorischen Aktivität zurück. Die mit Apelin i.c.v. und PBS peripher injizierten Versuchstiere der LPS-Studie hatten dabei ebenfalls eine erhöhte 24 Std. Aktivität.

Ebenso zeigte die gleiche Versuchsgruppe innerhalb von 12 Std. nach den Injektionen, eine Tendenz zu erhöhter Wasseraufnahme. In der Literatur finden sich dazu kontroverse Daten, so berichten Publikationen bei der zentralen Applikation sowohl über die Steigerung (Taheri et al., 2002), eine Reduktion (Reaux et al., 2001; Clarke et al., 2009) als auch keinen Effekt (O'Shea et al., 2003; Mitra et al., 2006) auf die Wasseraufnahme.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob zentral (i.c.v.) mikroappliziertes PyrAp13 die durch ebenfalls zentral verabreichtes AngII induzierte Trinkantwort und die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors c-Fos im Bereich des PVN und MnPO zu modulieren vermag.

Der Apelin-Rezeptor weist eine hohe Sequenzhomologie mit dem Angiotensin II Rezeptor auf (O'Dowd et al., 1993) und es konnten bereits limitiert in einigen Studien Interaktionen der beiden Rezeptoren nachgewiesen werden. So konnte ein antagonistischer Effekt des Apelins auf AngII-induzierte kardiovaskuläre Effekte demonstriert (Ishida et al., 2004; Gurzu et al., 2006; Zhong et al., 2007; Chun et al., 2008; Siddiquee et al., 2011) und eine direkte physikalische Interaktion der beiden Rezeptoren anhand von FRET-Versuchen unterstützt werden (Chun et al., 2008). Weiterhin konnte in mit dem Angiotensin Rezeptor AT1 und APJ co-transfizierten HEK-293 Zellen gezeigt werden, dass der nicht aktivierte Apelin-Rezeptor durch AT1 aktivierte Signalkaskaden zu unterdrückten vermochte (Sun et al., 2011).

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte PyrAp13 jedoch keinen Einfluss auf die durch i.c.v. Applikation von AngII induzierte Trinkwasseraufnahme. Wie bereits zuvor dargestellt, finden sich in der Literatur kontroverse Darstellungen zur Beeinflussung des Trinkverhaltens bei alleiniger zentraler Apelin-Applikation (siehe oben). Möglicherweise hatte PyrAp13 unter den gewählten Versuchsbedingungen weder eine dipsogene *per se* noch eine inhibitorische Wirkung auf die AngII-induzierte Trinkantwort. Dies wurde bereits in anderen Studien angedeutet (O'Shea et al., 2003; Mitra et al., 2006). Für diese These spricht, dass in den beiden anderen *in vivo* Studien der vorliegenden Arbeit ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf das Trinkverhalten festgestellt werden konnte. Eine Modulation efferenter Komponenten des Salz- und Wasserhaushaltes wie renale H₂O- oder Ionenelimination oder Salzappetit durch zentral wirkendes Apelin kann natürlich nicht ausgeschlossen werden.

Zentral (i.c.v.) appliziertes Angiotensin II induzierte eine signifikante Zunahme der Anzahl c-Fos immunpositiver Zellen im PVN, MnPO und SON. Eine durch zentrale Verabreichung von AngII induzierte Expression des *immediate-early* Gens in diesen Regionen konnte bereits gezeigt werden (Herbert et al., 1992). Die zusätzliche Apelinbehandlung führte zu keinem Unterschied in der AngII-induzierten FOS Aktivierung in allen untersuchten Strukturen. Auch konnte die alleinige Applikation von Apelin selbst kein FOS in den genannten Gebieten induzieren. Zur Induktion von c-Fos durch Apelin in hypothalamischen und thalamischen Nuclei existieren nur wenige Veröffentlichungen mit teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnissen. So konnten Kagiya et al. (2005) bei der Applikation von PyrAp13 in den Lateralventrikel, jedoch nicht bei intravenöser Verabreichung, eine Induktion von c-Fos im PVN beobachten. Dies ist in der betreffenden Arbeit jedoch nur anhand zweier Fotografien immunhistochemischer Markierungen des PVN dargestellt. Das heißt es erfolgte keine quantitative Auswertung der absoluten Zahl aktivierter Zellen. Eine weitere Studie konnte durch die intraperitoneale Applikation von Apelin12 gesteigerte Immunreaktivität für c-Fos u.a. im *Nucleus paraventricularis thalami* und im BNST, jedoch keine gesteigerte c-Fos Aktivität im *Nucleus paraventricularis hypothalami* beobachten (Takayama et al., 2008). Im Gegensatz dazu führte die Applikation von Apelin17 ebenfalls in den Lateralventrikel sowohl in den magnozellulären als auch parvozellulären Teilen des PVN zu einer Inhibierung der c-Fos Expression (Bodineau et al., 2011). Die genannten Studien unterscheiden sich jedoch von der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung in der Wahl des applizierten Peptids (Takayama et al., 2008; Bodineau et al., 2011), Verabreichungsort (Takayama et al., 2008; Bodineau et al., 2011) und in der Verwendung laktierender weiblicher Tiere (Bodineau et al., 2011). Diese Unterschiede in der Durchführung der Studien könnten möglicherweise die beobachteten Abweichungen der Ergebnisse dieser Arbeit erklären.

Anhand der in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch dokumentierten ausgeprägten Co-Lokalisation von APJ und nNOS im PVN und SON könnte das apelingere System möglicherweise NO-vermittelt die AngII-induzierte c-Fos Expression beeinflussen. So konnte bereits anhand des NOS-Inhibitors L-NAME ein Einfluss von NO auf das durch die Applikation von AngII hervorgerufene Trinkverhalten gezeigt werden (Zhu und Herbert, 1997). Im Gegensatz dazu handelte es sich jedoch bei den in der vorliegenden Arbeit durch AngII aktivierten Zellen im PVN und im MnPO größtenteils um nicht nNOS-positive Zellen. Dies stimmt auch mit Zhu und Herbert (1997) überein, die ebenfalls eine niedrige Co-Lokalisation der durch zentrales AngII aktivierten c-Fos Zellen anhand der Co-Lokalisation des NOS-Marker NADPH-d in diesen Regionen zeigen konnten. Weiterhin führte jedoch in

der vorliegenden Arbeit weder die Applikation von PyrAp13 alleine noch in Kombination mit AngII gegenüber den entsprechenden Kontrollen zu einer Veränderung der absoluten Zahl an aktivierten nitregen Zellen. Dies scheint eine NO-vermittelte apelinerge Modulation von AngII-induzierten Parametern zumindest in diesen Regionen auszuschließen.

Von allen untersuchten Strukturen konnte nur im SCN eine jedoch nicht signifikante Erhöhung der c-Fos-positiven Zellen in beiden Apelingruppen beobachtet werden. Dieses Ergebnis müsste anhand zusätzlicher Untersuchungen verifiziert werden und könnte dann die von Reaux et al. (2002) vorgeschlagene Beeinflussung circadianer Rhythmik durch Apelin unterstützen.

Die meisten Studien untersuchten bisher nur die Auswirkungen einer Apelinapplikation auf die Körpertemperatur, lokomotorische Aktivität und Futter-/Wasseraufnahme während der Inaktivitätsphase der Versuchstiere. Mit dem Versuch zur circadianen Rhythmik sollte deshalb der Einfluss von unmittelbar vor Beginn der Aktivitätsphase i.c.v. injiziertem PyrAp13 auf diese Parameter untersucht werden.

Bei der Analyse des Rhythmus der Körpertemperatur führte die morgendliche i.c.v. Injektion von PyrAp13 nach vier Stunden zu einem Anstieg der Körpertemperatur, wobei dieser nicht signifikant ausfiel. Eine ähnliche Tendenz konnte beim Vergleich mit der Kontrollgruppe des LPS-Versuchs, welche nur i.c.v. Apelin injiziert bekam, beobachtet werden. In der Literatur wird ebenfalls über einen Anstieg der Körpertemperatur nach einmaliger Applikation von Apelin13 während der Inaktivitätsphase bei Ratten und Mäusen berichtet (Jaszberenyi et al., 2004; Higuchi et al., 2007). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde bei der Injektion vor Beginn der Dunkelphase ebenfalls ein tendenzieller Anstieg der Körpertemperatur, jedoch bereits nach 1 bis 2 Std. festgestellt. Möglicherweise war dies durch die *per se* höhere Aktivität und Körpertemperatur in der Aktivitätsphase bedingt. Zu einer Injektion von Apelin unmittelbar vor Beginn der Aktivitätsphase der Tiere und einem damit verbundenen Einfluss auf die Körpertemperatur existieren zurzeit keine Publikationen. Valle et al. (2008) konnten jedoch anhand einer chronischen i.c.v.-Infusion von Apelin13 in Mäusen ebenfalls einen Anstieg der Körpertemperatur, allerdings bedingt durch erhöhte lokomotorische Aktivität, beobachten. Im Gegensatz dazu berichten Jaszberenyi et al. (2004) dass ihre einmalige i.c.v. Applikation keinen Einfluss auf die spontane lokomotorische Aktivität hatte. Die Daten hierzu sind jedoch nicht in ihrer Veröffentlichung gezeigt. Trotzdem konnten sie im *open field test* eine Erhöhung des *square crossing* durch eine Dosis von 10 µg Apelin13 zeigen. Eine erhöhte lokomotorische Aktivität (24h Std.) konnte in dem Versuch zur circadianen Rhythmik

der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu den Kontrollgruppen des ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführten LPS-Versuchs, nicht beobachtet werden. Möglicherweise entwickelt PyrAp13 deshalb bei zentraler einmaliger Bolusinjektion nur bei Applikation in der Inaktivitätsphase der Tiere einen Einfluss auf die lokomotorische Aktivität. Dies könnte bei der abendlichen Injektion durch die Überlagerung mit dem circadian bedingten stimulatorischen Effekt des Beginns der Aktivitätsphase auf die spontane Aktivität begründet sein.

Die Apelin-behandelte Gruppe der Tiere zeigte vom Übergang der zweiten Nacht nach der ersten abendlichen Injektion zum folgenden Tag eine leicht erhöhte Temperatur gegenüber der Kontrollgruppe. Anscheinend war diese Reaktion durch den Futter- und Wasserentzug zu Beginn der Nacht bedingt. Im Gegensatz dazu zeigte die Apelin-injizierte Gruppe nach der dritten Injektion ebenfalls vor Beginn der Dunkelphase eine leichte Hypothermie. Möglicherweise könnte dies durch einen erhöhten Plasmainsulinspiegel bedingt sein. So führte die zentrale Applikation von PyrAp13 bei gefasteten Mäusen unter anderem zu einer Hyperinsulinämie (Duparc et al., 2011) und für eine experimentelle Erhöhung des Insulinspiegels durch i.v. Injektion konnte eine Reduktion der Körpertemperatur gezeigt werden (Almeida und Branco, 2001).

Der Vergleich der Versuchsgruppen mit PyrAp13-Injektion mit der entsprechenden Kontrollgruppe des Versuchs zur circadianen Rhythmik ergab sowohl bei den Injektionen mit Futter-Wasserrestriktion als auch ohne einen Entzug keine signifikanten Unterschiede bezüglich der nächtlichen Futter- und Wasseraufnahme nach 6, 12 und 24 Stunden (*siehe Erg. Kap. V.3*). Es konnte jedoch eine Tendenz zu reduzierter Futter- und Wasseraufnahme innerhalb der ersten 6 Std. nach der Injektion ohne Restriktion beobachtet werden. Beim Vergleich der *in vivo* Versuche der vorliegenden Arbeit konnte weder bei der Verabreichung von PyrAp13 während der Inaktivitätsphase der Tiere (*siehe LPS-Versuch: Erg. Kap. V.1*) noch bei der Applikation vor *lights out* im Versuch zur circadianen Rhythmik ein Unterschied bezüglich der 24 Std. Futter- und Wasseraufnahme festgestellt werden. Jedoch konnte beim LPS-Versuch ebenfalls eine Tendenz zu reduzierter Wasseraufnahme der PyrAp13+PBS-Gruppe im Zeitraum von 12 Std. nach der Injektion festgestellt werden. Die 6 Std. Aufnahme war aufgrund der geringen Trinkmenge in diesem Zeitraum nicht dargestellt.

In der einzigen Studie mit i.c.v. Applikation vor Beginn der Aktivitätsphase konnte durch die Injektion von Apelin12 (10 nmol) bei Ratten ebenfalls eine Reduktion der nächtlichen Futteraufnahme für den Zeitraum von 2 bis 4 Std. nach der Verabreichung gezeigt werden (O'Shea et al., 2003). Beim Vergleich der in dieser Arbeit nicht dargestellten 1Std.-Werte der Futteraufnahme nach Injektion vor *lights out* konnte jedoch ebenfalls keine signifikante

Reduktion in diesem Zeitraum im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Für die 24 Std. Futteraufnahme gaben O'Shea et al. (2003) an, dass sich diese nicht mehr von der Kontrollgruppe unterschied. Dies war bei den abendlichen Injektionen der vorliegenden Arbeit ebenfalls gegeben.

Die Wasseraufnahme wurde allerdings im Gegensatz zur Futteraufnahme in der Studie von O'Shea et al. (2003) durch die Injektion von Apelin12 nicht beeinflusst. Jedoch ist dieser Parameter in der Veröffentlichung nur als 15Std.-Übernacht-Aufnahme dargestellt und ein Einfluss auf die ersten 6 Stunden deshalb daraus nicht ersichtlich.

Generell verwendeten O'Shea et al. (2003) in ihrer Studie einige zu den in den Versuchen der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Parameter, wie einen anderen Rattenstamm und Apelin12 statt die pyroglutamylierte Form des Peptids. Dies könnte sich möglicherweise auf die untersuchten Parameter auswirken. Für Apelin12 (i.v.) konnte zum Beispiel auch eine potentere Wirkung als für Apelin13 und Apelin36 in Bezug auf die Absenkung des Blutdrucks gezeigt werden (Tatemoto et al., 2001).

Auch bei den abendlichen Injektionen mit vorherigem 24Std. Futter- und Wasserentzug konnte kein Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren nach 6, 12 und 24 Std. festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu (Sunter et al., 2003), die jedoch während der Inaktivitätsphase bei gefasteten Tieren, bei Applikation von Apelin13 (10 nmol) statt PyrAp13, eine Reduktion der 24 Std. Futteraufnahme zeigen konnten. Ebenfalls in der Inaktivitätsphase konnte kein Effekt in nicht gefasteten Tieren, jedoch in gefasteten Tieren eine Reduktion der Futteraufnahme nur innerhalb 2 bis 4 Std. nach der Injektion von PyrAp13 (30 nmol) beobachtet werden (Taheri et al., 2002). Aufgrund der unterschiedlichen Injektionszeitpunkte erscheint ein Vergleich dieser Studien mit der abendlichen Injektion im Versuch der vorliegenden Arbeit jedoch schwierig. Offensichtlich zeigte PyrAp13 bei der Injektion vor der Aktivitätsphase in der vorliegenden Arbeit kein Effekt bezüglich der Futter-/Wasseraufnahme bei Tieren mit vorherigem Futter- und Wasserentzug.

V. Schlussfolgerungen

Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten semiquantitativen Kartierung durch immunhistochemischen Markierungen für APJ konnte eine ausgeprägte Expression in zahlreichen hypothalamischen und extrahypothalamischen Strukturen detektiert werden. In einigen dieser Strukturen konnte mit der gleichen Methode zusätzlich die Expression von Apelin17 und/oder Apelin13 nachgewiesen werden. Die meisten bisherigen Studien zur

Expression des Rezeptors waren nicht sehr detailliert und beschränkten sich meist auf die Untersuchung der mRNA. Deshalb konnte in der vorliegenden Arbeit unter anderem im BNST, PVA, ARC, MnPO, OVLT die Expression des Apelinrezeptors zum ersten Mal beschrieben werden.

Die mögliche Rolle des apelinergen Systems im BNST bei der Kontrolle von sexuellem Verhalten und der Sekretion von Gonadotropinen, der Vermittlung von Gefühlen wie Angst und Besorgnis, sowie bei der Regulation der HPA-Achse bei akutem und chronischem Stress bleibt dabei durch weitere Versuche zu klären. Ebenso müssten weitere Versuche zur Rolle des apelinergen Systems in der Regulation des Energiehaushaltes auch aufgrund der Expression im ARC durchgeführt werden. Weiterhin bleibt eine Beteiligung von APJ/Apelin an der Regulation circadianer Rhythmen aufgrund der ausgeprägten Expression im PVA zu untersuchen.

Die erstmals dokumentierte Expression des Rezeptors im MnPO und OVLT unterstützt zusammen mit der bereits beschriebenen und auch in der vorliegenden Arbeit bestätigten Expression im PVN und SON und weiteren Kerngebieten die These der Involvierung des apelinergen Systems bei der Regulation der Körpertemperatur und des Wasserhaushaltes.

NO spielt bei der Kontrolle vieler physiologischer Funktionen wie unter anderem der Körpertemperatur als auch der Wasserhomöostase eine wichtige Rolle. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben immunhistochemischen Co-Expression von APJ und nNOS in Zellen von SON, PVN, MnPO und OVLT könnte deshalb die Beteiligung von NO an den bereits beschriebenen zentral vermittelten apelinergen Effekten auf die Körpertemperatur und den Wassermetabolismus eine Rolle spielen.

Viele peptiderge Neurotransmitter vermitteln ihre Funktion unter anderem über eine Modulation klassischer Neurotransmitter wie Glutamat oder GABA. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals sowohl ein stimulierender als auch ein inhibitorischer Effekt von PyrAp13 auf den glutamatergen Calciumeinstroms in bestimmten Astrozyten- und Neuronen-Populationen einer PVN- und MnPO-spezifischen neuroglialen Primärkultur nachgewiesen werden. Obwohl es sich bei den modulierten Zellen hauptsächlich um nicht nitrerge Zellen handelte, konnte die Identität bezüglich einer nNOS-Expression in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Dies gilt es in zukünftigen Experimenten weiter zu untersuchen um so Aufschluss über die Vermittlung möglicher NO-abhängiger und -unabhängiger physiologischer apelinerner Effekte zu erlangen.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den immunhistochemischen Untersuchungen eine ausgeprägte Expression von APJ und Apelin im Zwischenlappen der Hypophyse festgestellt. In einer primären Zellkultur dieser Struktur konnte im Rahmen der experimentellen Untersuchungen eine hohe Co-Lokalisation des Rezeptors mit PACAP38, Apelin und ACTH beobachtet werden. PACAP38 stimuliert die Expression des POMC-Gens und, wie ebenfalls bereits für Apelin beschrieben, die Freisetzung von α -MSH und ACTH. Durch die Co-Expression könnte somit das apelinerge System mit PACAP38 bei der Einflussnahme auf die Sekretion von α -MSH und ACTH mitwirken.

Verschiedene Publikationen haben bereits den Effekt einer zentralen Applikation von PyrAp13 und anderer Formen auf die Körpertemperatur und die Futter- /Wasseraufnahme von Ratten und Mäusen jedoch zumeist in der Inaktivitätsphase der Versuchstiere untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Effekt von i.c.v. PyrAp13 vor Beginn der Aktivitätsphase auf diese Parameter überprüft. In den durchgeführten Experimenten konnte jedoch gegenüber den Kontrollen keine signifikante Änderung in den untersuchten Parametern festgestellt werden.

Der Apelinrezeptor und der AngII-Rezeptor AT1 zeigen eine hohe Sequenzhomologie und von einer zellulären Interaktion der beiden Rezeptoren wurde bereits berichtet. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Unterschied in der durch i.c.v. AngII-induzierten Trinkantwort und der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors c-Fos im PVN und MnPO nachgewiesen werden.

Durch die zentrale Applikation von PyrAp13 in Ratten wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein antipyretischer Effekt auf LPS-induziertes Fieber beschrieben. Weitere Komponenten des *sickness behaviors* wurden durch die Applikation nicht signifikant beeinflusst, jedoch konnte ein reduzierter TNF- α -Plasmaspiegel beobachtet werden. Auch für andere Neuropeptide, wie unter anderem α -MSH, ACTH und Vasopressin, wurde bereits eine antipyretische Funktion beschrieben. Die durch PyrAp13 vermittelte Antipyrese könnte dabei als indirekter Effekt durch die genannten Peptide vermittelt sein. Dafür spricht, dass bereits für alle genannten Peptide eine Einflussnahme des apelinergen Systems auf ihre Sekretion nachgewiesen wurde. Die apelinerge Stimulation der ACTH-Freisetzung könnte dabei auch, wie bei i.c.v. Applikation von ACTH bereits gezeigt, die beobachtete Absenkung des TNF- α -Plasmaspiegels induzieren. Durch zukünftige Experimente bleibt jedoch zu verifizieren, mit Hilfe welcher Mechanismen die Apelin-induzierte Antipyrese und das Absenken des TNF- α -Plasmaspiegels verursacht werden.

E. Literatur

- Abe, T., H. Sugihara, H. Nawa, R. Shigemoto, N. Mizuno, and S. Nakanishi, 1992, Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/ Ca^{2+} signal transduction: *J.Biol.Chem.*, v. 267, no. 19, p. 13361-13368.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles, 2001, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition: *Biochem.J.*, v. 357, no. Pt 3, p. 593-615.
- Allen, L. S., and R. A. Gorski, 1990, Sex difference in the bed nucleus of the stria terminalis of the human brain: *J.Comp. Neurol.*, v. 302, no. 4, p. 697-706.
- Alm, P., G. Skagerberg, A. Nylen, B. Larsson, and K. E. Andersson, 1997, Nitric oxide synthase and vasopressin in rat circumventricular organs. An immunohistochemical study: *Exp.Brain Res.*, v. 117, no. 1, p. 59-66.
- Almeida, M. C., and L. G. Branco, 2001, Role of nitric oxide in insulin-induced hypothermia in rats: *Brain Res.Bull.*, v. 54, no. 1, p. 49-53.
- Anderson, B., and S. M. McCann, 1956, The effect of hypothalamic lesions on the water intake of the dog: *Acta Physiol. Scand.*, v. 35, no. 3-4, p. 312-320.
- Antunes-Rodrigues, J., de Castro, M., L. L. Elias, M. M. Valenca, and S. M. McCann, 2004, Neuroendocrine control of body fluid metabolism: *Physiol. Rev.*, v. 84, no. 1, p. 169-208.
- Araki, S., Y. Shimada, K. Kaji, and H. Hayashi, 1990, Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 168, no. 3, p. 1194-1200.
- Aramori, I., and S. Nakanishi, 1992, Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells: *Neuron*, v. 8, no. 4, p. 757-765.
- Atluri, P., K. J. Morine, G. P. Liao, C. M. Panlilio, M. F. Berry, V. M. Hsu, W. Hiesinger, J. E. Cohen, and W. Y. Joseph, 2007, Ischemic heart failure enhances endogenous myocardial apelin and APJ receptor expression: *Cell. Mol.Biol.Lett.*, v. 12, no. 1, p. 127-138.
- Auerbach, C., M. Moutschen-Dahmen, and J. Moutschen, 1977, Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds: *Mutat.Res.*, v. 39, no. 3-4, p. 317-361.
- Azizi, M., X. Iturrioz, A. Blanchard, S. Peyrard, M. N. De, N. Chartrel, H. Vaudry, P. Corvol, and C. Llorens-Cortes, 2008, Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli: *J.Am.Soc.Nephrol.*, v. 19, no. 5, p. 1015-1024.
- Bacci, A., J. R. Huguenard, and D. A. Prince, 2002, Differential modulation of synaptic transmission by neuropeptide Y in rat neocortical neurons: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 99, no. 26, p. 17125-17130.
- Bai, B., Y. H. Liu, and H. Q. Liu, 2007, Effect of nitric oxide on the expression of apelin receptor mRNA in rat caudate nucleus: *Neurosci.Bull.*, v. 23, no. 3, p. 180-184.

- Bai, B., J. Tang, H. Liu, J. Chen, Y. Li, and W. Song, 2008, Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the Gi2 pathway: *Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai)*, v. 40, no. 4, p. 311-318.
- Bellinger, L. L., and L. L. Bernardis, 2002, The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies: *Physiol. Behav.*, v. 76, no. 3, p. 431-442.
- Bernardini, G. L., D. B. Richards, and J. M. Lipton, 1984, Antipyretic effect of centrally administered CRF: *Peptides*, v. 5, no. 1, p. 57-59.
- Bezzi, P., G. Carmignoto, L. Pasti, S. Vesce, D. Rossi, B. L. Rizzini, T. Pozzan, and A. Volterra, 1998, Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes: *Nature*, v. 391, no. 6664, p. 281-285.
- Bhatnagar, S., and M. F. Dallman, 1998, Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress: *Neuroscience*, v. 84, no. 4, p. 1025-1039.
- Bhatnagar, S., and M. F. Dallman, 1999, The paraventricular nucleus of the thalamus alters rhythms in core temperature and energy balance in a state-dependent manner: *Brain Res.*, v. 851, no. 1-2, p. 66-75.
- Bingham, B., C. Myung, L. Innala, M. Gray, A. Anonuevo, and V. Viau, 2011, Androgen receptors in the posterior bed nucleus of the stria terminalis increase neuropeptide expression and the stress-induced activation of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: *Neuropsychopharmacology*, v. 36, no. 7, p. 1433-1443.
- Bock, M., J. Roth, M. J. Kluger, and E. Zeisberger, 1994, Antipyresis caused by stimulation of vasopressinergic neurons and intraseptal or systemic infusions of gamma-MSH: *Am.J.Physiol.*, v. 266, no. 2 Pt 2, p. R614-R621.
- Bodineau, L., C. Taveau, H. H. Le Quan Sang, G. Osterstock, I. Queguiner, F. Moos, A. Frugiere, and C. Llorens-Cortes, 2011, Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats: *Endocrinology*, v. 152, no. 9, p. 3492-3503.
- Boucher, J.; Masri, B.; Daviaud, D.; Gesta, S.; Guigne, C.; Mazzucotelli, A.; Castan-Laurell, I.; Tack, I.; Knibiehler, B.; Carpenne, C.; Audigier, Y.; Saulnier-Blache, J.S. and Valet, P., 2005, Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity: *Endocrinology*, v. 146, no. 4, p. 1764-1771.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal.Biochem.*, v. 72, p. 248-254.
- Brailoiu, G. C., S. L. Dun, J. Yang, M. Ohsawa, J. K. Chang, and N. J. Dun, 2002, Apelin-immunoreactivity in the rat hypothalamus and pituitary: *Neurosci.Lett.*, v. 327, no. 3, p. 193-197.
- Braun, P. E., F. Sandillon, A. Edwards, J. M. Matthieu, and A. Privat, 1988, Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2'3'-cyclic nucleotide 3'

phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain: *J.Neurosci.*, v. 8, no. 8, p. 3057-3066.

Bredt, D. S., P. M. Hwang, and S. H. Snyder, 1990, Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide: *Nature*, v. 347, no. 6295, p. 768-770.

Brownstein, M. J., J. T. Russell, and H. Gainer, 1980, Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones: *Science*, v. 207, no. 4429, p. 373-378.

Burnashev, N., 1998, Calcium permeability of ligand-gated channels: *Cell Calcium*, v. 24, no. 5-6, p. 325-332.

Burnashev, N., A. Villarroel, and B. Sakmann, 1996, Dimensions and ion selectivity of recombinant AMPA and kainate receptor channels and their dependence on Q/R site residues: *J.Physiol.*, v. 496 Pt 1, p. 165-173.

Burnashev, N., Z. Zhou, E. Neher, and B. Sakmann, 1995, Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes: *J.Physiol.*, v. 485 Pt 2, p. 403-418.

Cabou, C., P. D. Cani, G. Campistron, C. Knauf, C. Mathieu, C. Sartori, J. Amar, U. Scherrer, and R. Burcelin, 2007, Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes: *Diabetes*, v. 56, no. 12, p. 2872-2877.

Camacho A., and M.I. Phillips, 1987, Circumventricular Organs and Body Fluids: Boca Raton, FL, USA, CRC Press.

Ceccatelli, S., J. M. Lundberg, J. Fahrenkrug, D. S. Bredt, S. H. Snyder, and T. Hökfelt, 1992, Evidence for involvement of nitric oxide in the regulation of hypothalamic portal blood flow: *Neuroscience*, v. 51, no. 4, p. 769-772.

Chang, T. L., and Y. P. Loh, 1984, In vitro processing of proopiomelanocortin by membrane-associated and soluble converting enzyme activities from rat intermediate lobe secretory granules: *Endocrinology*, v. 114, no. 6, p. 2092-2099.

Charles, C. J., M. T. Rademaker, and A. M. Richards, 2006, Apelin-13 induces a biphasic haemodynamic response and hormonal activation in normal conscious sheep: *J.Endocrinol.*, v. 189, no. 3, p. 701-710.

Charo, D.N.; Ho, M.; Fajardo, G.; Kawana, M.; Kundu, R.K.; Sheikh, A.Y.; Finsterbach, T.P.; Leeper, N.J.; Ernst, K.V.; Chen, M.M.; Ho, Y.D.; Chun, H.J.; Bernstein, D.; Ashley, E.A. and Quertermous, T., 2009, Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ: *Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.*, v. 297, no. 5, p. H1904-H1913.

Chavis, P., H. Shinozaki, J. Bockaert, and L. Fagni, 1994, The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells: *J.Neurosci.*, v. 14, no. 11 Pt 2, p. 7067-7076.

Chen, H. S., and S. A. Lipton, 2006, The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists: *J.Neurochem.*, v. 97, no. 6, p. 1611-1626.

- Chen, M.M.; Ashley, E.A.; Deng, D.X.; Tsalenko, A.; Deng, A.; Tabibiazar, R.; Ben-Dor, A.; Fenster, B.; Yang, E.; King, J.Y.; Fowler, M.; Robbins, R.; Johnson, F.L.; Bruhn, L.; McDonagh, T.; Dargie, H.; Yakhini, Z.; Tsao, P.S. and Quertermous, T., 2003, Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction: *Circulation*, v. 108, no. 12, p. 1432-1439.
- Chiba, T., and Y. Murata, 1985, Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study: *Brain Res.Bull.*, v. 14, no. 3, p. 261-272.
- Choe, W., A. Albright, J. Sulcove, S. Jaffer, J. Hesselgesser, E. Lavi, P. Crino, and D. L. Kolson, 2000, Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells: *J.Neurovirol.*, v. 6 Suppl 1, p. S61-S69.
- Choi, D. C., N. K. Evanson, A. R. Furay, Y. M. Ulrich-Lai, M. M. Ostrander, and J. P. Herman, 2008, The anteroventral bed nucleus of the stria terminalis differentially regulates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to acute and chronic stress: *Endocrinology*, v. 149, no. 2, p. 818-826.
- Choi, D. C., A. R. Furay, N. K. Evanson, M. M. Ostrander, Y. M. Ulrich-Lai, and J. P. Herman, 2007, Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs: *J.Neurosci.*, v. 27, no. 8, p. 2025-2034.
- Choi, D. W., M. Maulucci-Gedde, and A. R. Kriegstein, 1987, Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: *J.Neurosci.*, v. 7, no. 2, p. 357-368.
- Chrousos, G. P., 2009, Stress and disorders of the stress system: *Nat.Rev.Endocrinol.*, v. 5, no. 7, p. 374-381.
- Chun, H.J.; Ali, Z.A.; Kojima, Y.; Kundu, R.K.; Sheikh, A.Y.; Agrawal, R.; Zheng, L.; Leeper, N.J.; Pearl, N.E.; Patterson, A.J.; Anderson, J.P.; Tsao,P.S.; Lenardo, M.J.; Ashley, E.A. and Quertermous,T., 2008, Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis: *J.Clin.Invest.*, v. 118, no. 10, p. 3343-3354.
- Ciriello, J., S. L. Hochstenbach, and L. Pastor Solano-Flores, 1996, Changes in NADPH diaphorase activity in forebrain structures of the laminae terminalis after chronic dehydration: *Brain Res.*, v. 708, no. 1-2, p. 167-172.
- Clarke, K. J., K. W. Whitaker, and T. M. Reyes, 2009, Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet: *J.Neuroendocrinol.*, v. 21, no. 2, p. 83-89.
- Cobellis, L., F. M. De, A. Mastrogiacomo, D. Giraldi, D. Dattilo, C. Scaffa, N. Colacurci, and L. A. De, 2007, Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia-complicated placentas: *Histol.Histopathol.*, v. 22, no. 1, p. 1-8.
- Colmers, W. F., K. Lukowiak, and Q. J. Pittman, 1988, Neuropeptide Y action in the rat hippocampal slice: site and mechanism of presynaptic inhibition: *J.Neurosci.*, v. 8, no. 10, p. 3827-3837.
- Cook, D. R., A. J. Gleichman, S. A. Cross, S. Doshi, W. Ho, K. L. Jordan-Sciutto, D. R. Lynch, and D. L. Kolson, 2011, NMDA receptor modulation by the neuropeptide apelin: implications for excitotoxic injury: *J.Neurochem.*, v. 118, no. 6, p. 1113-1123.

- Coons, A. H., and M. H. Kaplan, 1950, Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody: *J.Exp.Med.*, v. 91, no. 1, p. 1-13.
- Cooper, K. E., A. M. Naylor, and W. L. Veale, 1987, Evidence supporting a role for endogenous vasopressin in fever suppression in the rat: *J.Physiol.*, v. 387, p. 163-172.
- Costa, A., P. Trainer, M. Besser, and A. Grossman, 1993, Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro: *Brain Res.*, v. 605, no. 2, p. 187-192.
- Cottrell, G. T., and A. V. Ferguson, 2004, Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation: *Regul.Pept.*, v. 117, no. 1, p. 11-23.
- Crack, P. J., D. J. Autelitano, and A. I. Smith, 1997, The involvement of nitric oxide in the secretion of beta-endorphin from the pituitary intermediate lobe of the rat: *Brain Res.*, v. 761, no. 1, p. 113-120.
- Cui,R.R.; Mao,D.A.; Yi,L.; Wang,C.; Zhang,X.X.; Xie,H.; Wu,X.P.; Liao,X.B.; Zhou,H.; Meng,J.C.; Yuan,L.Q. and Liao,E.Y., 2010, Apelin suppresses apoptosis of human vascular smooth muscle cells via APJ/PI3-K/Akt signaling pathways: *Amino Acids*, v. 39, no. 5, p. 1193-1200.
- Currie, P. J., A. Mirza, L. M. Dono, C. S. John, and D. G. Wall, 2011, Anorexigenic action of nitric oxide synthase inhibition in the raphe nuclei: *Neuroreport*, v. 22, no. 14, p. 696-699.
- da Silva, R. K., W. A. Saad, A. Renzi, J. V. Menani, and L. A. Camargo, 1995, Effect of lateral hypothalamus lesions on the water and salt intake, and sodium and urine excretion induced by activation of the median preoptic nucleus in conscious rats: *J.Auton.Nerv.Syst.*, v. 53, no. 2-3, p. 195-204.
- Dai, T., G. Ramirez-Correa, and W. D. Gao, 2006, Apelin increases contractility in failing cardiac muscle: *Eur.J.Pharmacol.*, v. 553, no. 1-3, p. 222-228.
- Daviaud, D.; Boucher, J.; Gesta, S.; Dray, C.; Guigne, C.; Quilliot, D.; Ayav, A.; Ziegler, O.; Carpenne, C.; Saulnier-Blache, J.S.; Valet, P. and Castan-Laurell, I., 2006, TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue: *FASEB J.*, v. 20, no. 9, p. 1528-1530.
- De Luca B., M. Monda, and A. Sullo, 1995, Changes in eating behavior and thermogenic activity following inhibition of nitric oxide formation: *Am.J.Physiol.*, v. 268, no. 6 Pt 2, p. R1533-R1538.
- De Mota, N., Z. Lenkei, and C. Llorens-Cortes, 2000, Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor: *Neuroendocrinology*, v. 72, no. 6, p. 400-407.
- De Mota, N.; Reaux-Le,Goazigo A.; El,Messari S.; Chartrel, N.; Roesch, D.; Dujardin, C.; Kordon, C.; Vaudry, H.; Moos, F. and Llorens-Cortes, C., 2004, Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 101, no. 28, p. 10464-10469.

Donato, J., Jr., R. Frazao, M. Fukuda, C. R. Vianna, and C. F. Elias, 2010, Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons: *Endocrinology*, v. 151, no. 11, p. 5415-5427.

Dong, H. W., G. D. Petrovich, and L. W. Swanson, 2001a, Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis: *Brain Res.Rev.*, v. 38, no. 1-2, p. 192-246.

Dong, H. W., G. D. Petrovich, A. G. Watts, and L. W. Swanson, 2001b, Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain: *J.Comp. Neurol.*, v. 436, no. 4, p. 430-455.

Dong, H. W., and L. W. Swanson, 2004, Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis: *J.Comp Neurol.*, v. 468, no. 2, p. 277-298.

Dray, C.; Debard, C.; Jager, J.; Disse, E.; Daviaud, D.; Martin, P.; Attane, C.; Wanecq, E.; Guigne, C.; Bost, F.; Tanti, J.F.; Laville, M.; Vidal, H.; Valet, P. and Castan-Laurell, I., 2010, Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans: *Am.J.Physiol. Endocrinol.Metab*, v. 298, no. 6, p. E1161-E1169.

Dray, C.; Knauf, C.; Daviaud, D.; Waget, A.; Boucher, J.; Buleon, M.; Cani, P.D.; Attane, C.; Guigne, C.; Carpene, C.; Burcelin, R.; Castan-Laurell, I. and Valet, P., 2008, Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice: *Cell. Metab*, v. 8, no. 5, p. 437-445.

Dunn, F. L., T. J. Brennan, A. E. Nelson, and G. L. Robertson, 1973, The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat: *J.Clin.Invest*, v. 52, no. 12, p. 3212-3219.

Duparc, T.; Colom, A.; Cani, P.D.; Massaly, N.; Rastrelli, S.; Drougard, A.; Le Gonidec, S.; Mouledous, L.; Frances, B.; Leclercq, I.; Llorens-Cortes, C.; Pospisilik, J.A.; Delzenne, N.M.; Valet, P.; Castan-Laurell, I. and Knauf, C., 2011, Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice: *Antioxid.Redox.Signal.*, v. 15, no. 6, p. 1477-1496.

Duvarci, S., E. P. Bauer, and D. Pare, 2009, The bed nucleus of the stria terminalis mediates inter-individual variations in anxiety and fear: *J.Neurosci.*, v. 29, no. 33, p. 10357-10361.

Edinger, A.L.; Hoffman, T.L.; Sharron, M.; Lee, B.; Yi, Y.; Choe, W.; Kolson, D.L.; Mitrovic, B.; Zhou, Y.; Faulds, D.; Collman, R.G.; Hesselgesser, J.; Horuk, R. and Doms, R.W., 1998, An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: *J.Virol.*, v. 72, no. 10, p. 7934-7940.

El Messari S., X. Iturrioz, C. Fassot, M. N. De, D. Roesch, and C. Llorens-Cortes, 2004, Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure: *J.Neurochem.*, v. 90, no. 6, p. 1290-1301.

Erdem, G., T. Dogru, I. Tasci, A. Sonmez, and S. Tapan, 2008, Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus: *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*, v. 116, no. 5, p. 289-292.

- Espevik, T., and J. Nissen-Meyer, 1986, A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes: *J.Immunol.Methods*, v. 95, no. 1, p. 99-105.
- Eyigor, O., A. Centers, and L. Jennes, 2001, Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus: *J.Comp. Neurol.*, v. 434, no. 1, p. 101-124.
- Fan, X., N. Zhou, X. Zhang, M. Mukhtar, Z. Lu, J. Fang, G. C. DuBois, and R. J. Pomerantz, 2003, Structural and functional study of the apelin-13 peptide, an endogenous ligand of the HIV-1 coreceptor, *APJ: Biochemistry*, v. 42, no. 34, p. 10163-10168.
- Fantuzzi, G., S. E. Di, S. Sacco, F. Benigni, and P. Ghezzi, 1995, Role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the regulation of TNF production in mice. Effect of stress and inhibition of endogenous glucocorticoids: *J.Immunol.*, v. 155, no. 7, p. 3552-3555.
- Farkasfalvi, K.; Stagg, M.A.; Coppen, S.R.; Siedlecka, U.; Lee, J.; Soppa, G.K.; Marczin, N.; Szokodi, I.; Yacoub, M.H. and Terracciano, C.M., 2007, Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 357, no. 4, p. 889-895.
- Fazekas de St.Groth, S., R. G. Webster, and A. Datyner, 1963, Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 71, p. 377-391.
- Fernandez, M., F. Sanchez-Franco, N. Palacios, I. Sanchez, C. Fernandez, and L. Cacicedo, 2004, IGF-I inhibits apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in pituitary cells: *J.Mol.Endocrinol.*, v. 33, no. 1, p. 155-163.
- Fioramonti, X.; Marsollier, N.; Song, Z.; Fakira, K.A.; Patel, R.M.; Brown, S.; Duparc, T.; Pica-Mendez, A.; Sanders, N.M.; Knauf, C.; Valet, P.; McCrimmon, R.J.; Beuve, A.; Magnan, C. and Routh, V.H., 2010, Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation: *Diabetes*, v. 59, no. 2, p. 519-528.
- Foldes, G.; Horkay, F.; Szokodi, I.; Vuolteenaho, O.; Ilves, M.; Lindstedt, K.A.; Mayranpaa, M.; Sarman, B.; Seres, L.; Skoumal, R.; Lako-Futo, Z.; deChatel, R.; Ruskoaho, H. and Toth, M., Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 308, no. 3, p. 480-485.
- Freeman, P. H., and P. J. Wellman, 1987, Brown adipose tissue thermogenesis induced by low level electrical stimulation of hypothalamus in rats: *Brain Res.Bull.*, v. 18, no. 1, p. 7-11.
- Furchgott, R. F., and J. V. Zawadzki, 1980, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine: *Nature*, v. 288, no. 5789, p. 373-376.
- Galli, G., and M. Fratelli, 1993, Activation of apoptosis by serum deprivation in a teratocarcinoma cell line: inhibition by L-acetylcarnitine: *Exp.Cell Res.*, v. 204, no. 1, p. 54-60.
- Gao, X. B., and A. N. van den Pol, 2001, Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus: *J.Physiol.*, v. 533, no. Pt 1, p. 237-252.

- Garthwaite, J., 2008, Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission: *Eur.J.Neurosci.*, v. 27, no. 11, p. 2783-2802.
- Gebke, E., A. R. Muller, M. Jurzak, and R. Gerstberger, 1998, Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs: *Neuroscience*, v. 85, no. 2, p. 509-520.
- Geiger, J. R., T. Melcher, D. S. Koh, B. Sakmann, P. H. Seeburg, P. Jonas, and H. Monyer, 1995, Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca^{2+} permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS: *Neuron*, v. 15, no. 1, p. 193-204.
- Gerstberger, R., 1999, Nitric oxide and body temperature control: *News Physiol. Sci.*, v. 14, p. 30-36.
- Gerstberger, R., Barth SW, Horowitz M, Hudl K, Patronas P, and Huebschle T, 2001, Differential activation of nitregic hypothalamic neurons by heat exposure and dehydration., in M.Kosaka, T.Sugahara, K.L.Schmidt, and E.Simon eds., *Thermotherapy for neoplasia, inflammation and pain.*: Tokyo, Springer Press, p. 43-62.
- Givalois, L., S. Li, and G. Pelletier, 2002, Central nitric oxide regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult male rats: *Mol.Brain Res.*, v. 102, no. 1-2, p. 1-8.
- Glyn, J. R., and J. M. Lipton, 1981, Hypothermic and antipyretic effects of centrally administered ACTH (1--24) and alpha-melanotropin: *Peptides*, v. 2, no. 2, p. 177-187.
- Graeber, M. B., R. B. Banati, W. J. Streit, and G. W. Kreutzberg, 1989, Immunophenotypic characterization of rat brain macrophages in culture: *Neurosci.Lett.*, v. 103, no. 3, p. 241-246.
- Green N.M., 1963, Avidin. 3. The nature of the biotin-binding site: *Biochem.J.*, v. 89, p. 599-609.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien, 1985, A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties: *J.Biol.Chem.*, v. 260, no. 6, p. 3440-3450.
- Guo, H., P. A. Castro, R. D. Palmiter, and S. C. Baraban, 2002, Y5 receptors mediate neuropeptide Y actions at excitatory synapses in area CA3 of the mouse hippocampus: *J.Neurophysiol.*, v. 87, no. 1, p. 558-566.
- Gurzu, B., B. C. Petrescu, M. Costuleanu, and G. Petrescu, 2006, Interactions between apelin and angiotensin II on rat portal vein: *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.*, v. 7, no. 4, p. 212-216.
- Habata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Fukusumi, S.; Kawamata, Y.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Nishizawa, N.; Murosaki, S.; Kurokawa, T.; Onda, H.; Tatemoto, K. and Fujino, M., Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1452, no. 1, p. 25-35.
- Hanslick, J. L., K. Lau, K. K. Noguchi, J. W. Olney, C. F. Zorumski, S. Mennerick, and N. B. Farber, 2009, Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system: *Neurobiol.Dis.*, v. 34, no. 1, p. 1-10.

- Hartley, D. M., M. C. Kurth, L. Bjerkness, J. H. Weiss, and D. W. Choi, 1993, Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration: *J.Neurosci.*, v. 13, no. 5, p. 1993-2000.
- Hashimoto, T.; Kihara, M.; Imai, N.; Yoshida, S.; Shimoyamada, H.; Yasuzaki, H.; Ishida, J.; Toya, Y.; Kiuchi, Y.; Hirawa, N.; Tamura, K.; Yazawa, T.; Kitamura, H.; Fukamizu, A. and Umemura, S., Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis: *Am.J.Pathol.*, v. 171, no. 5, p. 1705-1712.
- Hatakeyama, S., Y. Kawai, T. Ueyama, and E. Senba, 1996, Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express Fos following stress stimuli: *J.Chem.Neuroanat.*, v. 11, no. 4, p. 243-256.
- Hazell, G. G., C. C. Hindmarch, G. R. Pope, J. A. Roper, S. L. Lightman, D. Murphy, A. M. O'Carroll, and S. J. Lolait, 2011, G protein-coupled receptors in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei - serpentine gateways to neuroendocrine homeostasis: *Front. Neuroendocrinol.*
- Heinonen, M. V., A. K. Purhonen, P. Miettinen, M. Paakkonen, E. Pirinen, E. Alhava, K. Akerman, and K. H. Herzig, 2005, Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding: *Regul.Pept.*, v. 130, no. 1-2, p. 7-13.
- Herbert, J., M. L. Forsling, S. R. Howes, P. M. Stacey, and H. M. Shiers, 1992, Regional expression of c-fos antigen in the basal forebrain following intraventricular infusions of angiotensin and its modulation by drinking either water or saline: *Neuroscience*, v. 51, no. 4, p. 867-882.
- Herdegen, T., and J. D. Leah, 1998, Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins: *Brain Res.Rev.*, v. 28, no. 3, p. 370-490.
- Herman, J. P., and W. E. Cullinan, 1997, Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis: *Trends Neurosci.*, v. 20, no. 2, p. 78-84.
- Herman, J. P., H. Figueiredo, N. K. Mueller, Y. Ulrich-Lai, M. M. Ostrander, D. C. Choi, and W. E. Cullinan, 2003, Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness: *Front. Neuroendocrinol.*, v. 24, no. 3, p. 151-180.
- Higuchi, K., T. Masaki, K. Gotoh, S. Chiba, I. Katsuragi, K. Tanaka, T. Kakuma, and H. Yoshimatsu, 2007, Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice: *Endocrinology*, v. 148, no. 6, p. 2690-2697.
- Hindmarch, C., M. Fry, S. T. Yao, P. M. Smith, D. Murphy, and A. V. Ferguson, 2008, Microarray analysis of the transcriptome of the subfornical organ in the rat: regulation by fluid and food deprivation: *Am.J.Physiol. Regul.Integr.Comp Physiol.*, v. 295, no. 6, p. R1914-R1920.
- Hines, M., L. S. Allen, and R. A. Gorski, 1992, Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: *Brain Res.*, v. 579, no. 2, p. 321-326.

- Hirst, D. G., and T. Robson, 2011, Nitric oxide physiology and pathology: *Methods Mol.Biol.*, v. 704, p. 1-13.
- Hitzel, N., 2009, Charakterisierung ionotroper purinerger Rezeptoren im Nucleus medianus praeopticus des anterioren Hypothalamus der Ratte. Dissertation, Univ. Giessen
- Hitzel, N, D Ott, J Murgott, J Roth, R Gerstberger. Purinoceptor mediated signaling in neuronal and glial cells of the rat hypothalamic median preoptic nucleus. LBH: Proceedings 18.Tagung der DVG Fachgruppe Physiologie und Biochemie . 2007. Conference Proceeding
- Hoffman, T. L., E. B. Stephens, O. Narayan, and R. W. Doms, 1998, HIV type I envelope determinants for use of the CCR2b, CCR3, STRL33, and APJ coreceptors: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 95, no. 19, p. 11360-11365.
- Hollmann, M., M. Hartley, and S. Heinemann, 1991, Ca^{2+} permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition: *Science*, v. 252, no. 5007, p. 851-853.
- Honda, K., H. Negoro, T. Higuchi, and Y. Tadokoro, 1987, Activation of neurosecretory cells by osmotic stimulation of anteroventral third ventricle: *Am.J.Physiol.*, v. 252, no. 6 Pt 2, p. R1039-R1045.
- Horn, T., P. M. Smith, B. E. McLaughlin, L. Bause, G. S. Marks, Q. J. Pittman, and A. V. Ferguson, 1994, Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications: *Am.J.Physiol.*, v. 266, no. 1 Pt 2, p. R306-R313.
- Hosoya, M.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Fujii, R.; Habata, Y.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Honda, S.; Kurokawa, T.; Onda, H.; Nishimura, O. and Fujino, M., 2000, Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 28, p. 21061-21067.
- Hus-Citharel, A., N. Bouby, A. Frugiere, L. Bodineau, J. M. Gasc, and C. Llorens-Cortes, 2008, Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney: *Kidney Int.*, v. 74, no. 4, p. 486-494.
- Iremonger, K. J., A. M. Benediktsson, and J. S. Bains, 2010, Glutamatergic synaptic transmission in neuroendocrine cells: Basic principles and mechanisms of plasticity: *Front. Neuroendocrinol.*, v. 31, no. 3, p. 296-306.
- Ishida, J.; Hashimoto, T.; Hashimoto, Y.; Nishiwaki, S.; Iguchi, T.; Harada, S.; Sugaya, T.; Matsuzaki, H.; Yamamoto, R.; Shiota, N.; Okunishi, H.; Kihara, M.; Umemura, S.; Sugiyama, F.; Yagami, K.; Kasuya, Y.; Mochizuki, N. and Fukamizu, A., 2004, Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo: *J.Biol.Chem.*, v. 279, no. 25, p. 26274-26279.
- Israel, J. M., D. A. Poulain, and S. H. Oliet, 2010, Glutamatergic inputs contribute to phasic activity in vasopressin neurons: *J.Neurosci.*, v. 30, no. 4, p. 1221-1232.
- Jackson, S., and P. J. Lowry, 1983, Secretion of pro-opiocortin peptides from isolated perfused rat pars intermedia cells: *Neuroendocrinology*, v. 37, no. 4, p. 248-257.

- Japp, A.G.; Cruden, N.L.; Amer, D.A.; Li, V.K.; Goudie, E.B.; Johnston, N.R.; Sharma, S.; Neilson, I.; Webb, D.J.; Megson, I.L.; Flapan, A.D. and Newby, D.E., 2008, Vascular effects of apelin in vivo in man: *J.Am.Coll.Cardiol.*, v. 52, no. 11, p. 908-913.
- Jaszberenyi, M., E. Bujdoso, and G. Telegdy, 2004, Behavioral, neuroendocrine and thermoregulatory actions of apelin-13: *Neuroscience*, v. 129, no. 3, p. 811-816.
- Jia, Y.X.; Lu, Z.F.; Zhang, J.; Pan, C.S.; Yang, J.H.; Zhao, J.; Yu, F.; Duan, X.H.; Tang, C.S. and Qi, Y.F., Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas: *Peptides*, v. 28, no. 10, p. 2023-2029.
- Johnson, A. K., and P. M. Gross, 1993, Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways: *FASEB J.*, v. 7, no. 8, p. 678-686.
- Jurzak, M., A. R. Muller, and R. Gerstberger, 1995, AVP-fragment peptides induce Ca²⁺ transients in cells cultured from rat circumventricular organs: *Brain Res.*, v. 673, no. 2, p. 349-355.
- Jurzak, M., A. R. Müller, H. A. Schmid, and R. Gerstberger, 1994, Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis: *Brain Res.*, v. 662, no. 1-2, p. 198-208.
- Kadekaro, M., 2004, Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophyseal system: *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 37, no. 4, p. 441-450.
- Kadekaro, M., and J. Y. Summy-Long, 2000, Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostases: *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.*, v. 27, no. 5-6, p. 450-459.
- Kagiyama, S., M. Fukuhara, K. Matsumura, Y. Lin, K. Fujii, and M. Iida, 2005, Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats: *Regul.Pept.*, v. 125, no. 1-3, p. 55-59.
- Kalsbeek, A., R. Teclemariam-Mesbah, and P. Pevet, 1993, Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): *J.Comp. Neurol.*, v. 332, no. 3, p. 293-314.
- Kang, J., L. Jiang, S. A. Goldman, and M. Nedergaard, 1998, Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission: *Nat.Neurosci.*, v. 1, no. 8, p. 683-692.
- Kapuscinski, J., 1990, Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes: *J.Histochem.Cytochem.*, v. 38, no. 9, p. 1323-1329.
- Kasai, A.; Shintani, N.; Kato, H.; Matsuda, S.; Gomi, F.; Haba, R.; Hashimoto, H.; Kakuda, M.; Tano, Y. and Baba, A., 2008, Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice: *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 28, no. 10, p. 1717-1722.
- Katugampola, S. D., J. J. Maguire, S. R. Matthewson, and A. P. Davenport, 2001, [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man: *Br.J.Pharmacol.*, v. 132, no. 6, p. 1255-1260.

- Kawamata, Y.; Habata, Y.; Fukusumi, S.; Hosoya, M.; Fujii, R.; Hinuma, S.; Nishizawa, N.; Kitada, C.; Onda, H.; Nishimura, O. and Fujino, M., 2001, Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1538, no. 2-3, p. 162-171.
- Keilhoff, G., B. Seidel, M. Reiser, A. Stanarius, P. L. Huang, B. Bogerts, G. Wolf, and H. G. Bernstein, 2001, Lack of neuronal NOS has consequences for the expression of POMC and POMC-derived peptides in the mouse pituitary: *Acta Histochem.*, v. 103, no. 4, p. 397-412.
- Kimura, S., Y. Ohshige, L. Lin, T. Okumura, C. Yanaihara, N. Yanaihara, and Y. Shiotani, 1994, Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamus-pituitary system in rats: light and electron microscopic immunocytochemical studies: *J.Neuroendocrinol.*, v. 6, no. 5, p. 503-507.
- Kleinz, M. J., and A. P. Davenport, 2005, Emerging roles of apelin in biology and medicine: *Pharmacol.Ther.*, v. 107, no. 2, p. 198-211.
- Kleinz, M. J., J. N. Skepper, and A. P. Davenport, 2005, Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells: *Regul.Pept.*, v. 126, no. 3, p. 233-240.
- Klingenspor, M., 2003, Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis: *Exp.Physiol.*, v. 88, no. 1, p. 141-148.
- Knepper, M. A., 1997, Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin: *Am.J.Physiol.*, v. 272, no. 1 Pt 2, p. F3-F12.
- Koch, B., and B. Lutz-Bucher, 1992, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates cyclic AMP formation as well as peptide output of cultured pituitary melanotrophs and AtT-20 corticotrophs: *Regul.Pept.*, v. 38, no. 1, p. 45-53.
- Kombian, S. B., M. Hirasawa, D. Mouginot, and Q. J. Pittman, 2002, Modulation of synaptic transmission by oxytocin and vasopressin in the supraoptic nucleus: *Prog.Brain Res.*, v. 139, p. 235-246.
- Kopp, M. D., H. Meissl, F. Dehghani, and H. W. Korf, 2001, The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates glutamatergic calcium signalling: investigations on rat suprachiasmatic nucleus neurons: *J.Neurochem.*, v. 79, no. 1, p. 161-171.
- Kovacs, K. J., 1998, c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map: *Neurochem.Int.*, v. 33, no. 4, p. 287-297.
- Krettek, J. E., and J. L. Price, 1978, Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat: *J.Comp Neurol.*, v. 178, no. 2, p. 225-254.
- Kuba, K.; Zhang, L.; Imai, Y.; Arab, S.; Chen, M.; Maekawa, Y.; Leschnik, M.; Leibbrandt, A.; Markovic, M.; Schwaighofer, J.; Beetz, N.; Musialek, R.; Neely, G.G.; Komnenovic, V.; Kolm, U.; Metzler, B.; Ricci, R.; Hara, H.; Meixner, A.; Nghiem, M.; Chen, X.; Dawood, F.; Wong, K.M.; Sarao, R.; Cukerman, E.; Kimura, A.; Hein, L.; Thalhammer, J.; Liu, P.P.; and Penninger, J.M., 2007, Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload: *Circ.Res.*, v. 101, no. 4, p. e32-e42.

- Kurose, T., Y. Ueta, M. Nomura, K. Yamaguchi, and S. Nagata, 2001, Nociceptive stimulation increases NO synthase mRNA and vasopressin heteronuclear RNA in the rat paraventricular nucleus: *Auton.Neurosci.*, v. 88, no. 1-2, p. 52-60.
- Landgraf, R., T. Malkinson, T. Horn, W. L. Veale, K. Lederis, and Q. J. Pittman, 1990, Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats: *Am.J.Physiol.*, v. 258, no. 1 Pt 2, p. R155-R159.
- Lansdorp, P. M., L. A. Aarden, J. Calafat, and W. P. Zeiljemaker, 1986, A growth-factor dependent B-cell hybridoma: *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, v. 132, p. 105-113.
- Lee, D. K., R. Cheng, T. Nguyen, T. Fan, A. P. Kariyawasam, Y. Liu, D. H. Osmond, S. R. George, and B. F. O'Dowd, 2000, Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor: *J.Neurochem.*, v. 74, no. 1, p. 34-41.
- Lee, D. K., A. J. Lanca, R. Cheng, T. Nguyen, X. D. Ji, F. Gobeil, Jr., S. Chemtob, S. R. George, and B. F. O'Dowd, 2004, Agonist-independent nuclear localization of the apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors: *J.Biol.Chem.*, v. 279, no. 9, p. 7901-7908.
- Lee, D. K., V. R. Saldivia, T. Nguyen, R. Cheng, S. R. George, and B. F. O'Dowd, 2005, Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action: *Endocrinology*, v. 146, no. 1, p. 231-236.
- Lee, H. J., A. H. Macbeth, J. H. Pagani, and W. S. Young, III, 2009, Oxytocin: the great facilitator of life: *Prog.Neurobiol.*, v. 88, no. 2, p. 127-151.
- Leeper, N. J., M. M. Tedesco, Y. Kojima, G. M. Schultz, R. K. Kundu, E. A. Ashley, P. S. Tsao, R. L. Dalman, and T. Quertermous, 2009, Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation: *Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.*, v. 296, no. 5, p. H1329-H1335.
- Lind, R. W., and A. K. Johnson, 1983, A further characterization of the effects of AV3V lesions on ingestive behavior: *Am.J.Physiol.*, v. 245, no. 1, p. R83-R90.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen, 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method: *Methods*, v. 25, no. 4, p. 402-408.
- Lyudyno, V. I., I. N. Krasnova, M. P. Smirnova, and V. M. Klimenko, 2001, Antipyretic effect of neuropeptide galanin in endotoxin-induced fever: *Bull.Exp.Biol.Med.*, v. 131, no. 1, p. 60-63.
- Maguire, J. J., M. J. Kleinz, S. L. Pitkin, and A. P. Davenport, 2009, [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease: *Hypertension*, v. 54, no. 3, p. 598-604.
- Mains, R. E., and B. A. Eipper, 1979, Synthesis and secretion of corticotropins, melanotropins, and endorphins by rat intermediate pituitary cells: *J.Biol.Chem.*, v. 254, no. 16, p. 7885-7894.
- Malgaroli, A., D. Milani, J. Meldolesi, and T. Pozzan, 1987, Fura-2 measurement of cytosolic free Ca²⁺ in monolayers and suspensions of various types of animal cells: *J.Cell Biol.*, v. 105, no. 5, p. 2145-2155.

- Manukhina, E. B., H. F. Downey, and R. T. Mallet, 2006, Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia: *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, v. 231, no. 4, p. 343-365.
- Marson, O., C. L. Chernicky, K. L. Barnes, D. I. Diz, R. M. Slugg, and C. M. Ferrario, 1985, The anteroventral third ventricle region. Participation in the regulation of blood pressure in conscious dogs: *Hypertension*, v. 7, no. 3 Pt 2, p. I80-I87.
- Maruyama, M., M. Nishi, M. Konishi, Y. Takashige, K. Nagashima, T. Kiyohara, and K. Kanosue, 2003, Brain regions expressing Fos during thermoregulatory behavior in rats: *Am.J.Physiol. Regul.Integr.Comp. Physiol.*, v. 285, no. 5, p. R1116-R1123.
- Masri, B., H. Lahlou, H. Mazarguil, B. Knibiehler, and Y. Audigier, 2002, Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 290, no. 1, p. 539-545.
- Masri, B., N. Morin, M. Cornu, B. Knibiehler, and Y. Audigier, 2004, Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells: *FASEB J.*, v. 18, no. 15, p. 1909-1911.
- Mathai, M. L., H. Hjelmqvist, R. Keil, and R. Gerstberger, 1997, Nitric oxide increases cutaneous and respiratory heat dissipation in conscious rabbits: *Am.J.Physiol.*, v. 272, no. 6 Pt 2, p. R1691-R1697.
- McKinley, M. J., A. L. Albiston, A. M. Allen, M. L. Mathai, C. N. May, R. M. McAllen, B. J. Oldfield, F. A. Mendelsohn, and S. Y. Chai, 2003, The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles: *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, v. 35, no. 6, p. 901-918.
- McKinley, M. J., A. M. Allen, P. Burns, L. M. Colvill, and B. J. Oldfield, 1998, Interaction of circulating hormones with the brain: the roles of the subfornical organ and the organum vasculosum of the lamina terminalis: *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol. Suppl.*, v. 25, p. S61-S67.
- McKinley, M. J., A. M. Allen, S. Y. Chai, D. K. Hards, F. A. Mendelsohn, and B. J. Oldfield, 1989, The lamina terminalis and its neural connections: neural circuitry involved in angiotensin action and fluid and electrolyte homeostasis: *Acta Physiol. Scand.Suppl.*, v. 583, p. 113-118.
- McKinley, M. J., D. K. Hards, and B. J. Oldfield, 1994, Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing: *Brain Res.*, v. 653, no. 1-2, p. 305-314.
- McKinley, M. J., M. L. Mathai, G. Pennington, M. Rundgren, and L. Vivas, 1999, Effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep: *Am.J.Physiol.*, v. 276, no. 3 Pt 2, p. R673-R683.
- Medhurst, A.D.; Jennings, C.A.; Robbins, M.J.; Davis, R.P.; Ellis, C.; Winborn, K.Y.; Lawrie, K.W.; Hervieu, G.; Riley, G.; Bolaky, J.E.; Herrity, N.C.; Murdock, P. and Darker, J.G., 2003, Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin: *J.Neurochem.*, v. 84, no. 5, p. 1162-1172.
- Meral, C., E. Tascilar, F. Karademir, I. A. Tanju, F. Cekmez, O. M. Ipcioglu, C. N. Ercin, I. Gocmen, and T. Dogru, 2010, Elevated plasma levels of apelin in children with type 1 diabetes mellitus: *J.Pediatr.Endocrinol.Metab*, v. 23, no. 5, p. 497-502.

- Mitra, A., M. J. Katovich, A. Mecca, and N. E. Rowland, 2006, Effects of central and peripheral injections of apelin on fluid intake and cardiovascular parameters in rats: *Physiol. Behav.*, v. 89, no. 2, p. 221-225.
- Moga, M. M., and C. B. Saper, 1994, Neuropeptide-immunoreactive neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat: *J.Comp. Neurol.*, v. 346, no. 1, p. 137-150.
- Moga, M. M., C. B. Saper, and T. S. Gray, 1989, Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat: *J.Comp. Neurol.*, v. 283, no. 3, p. 315-332.
- Moga, M. M., R. P. Weis, and R. Y. Moore, 1995, Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat: *J.Comp Neurol.*, v. 359, no. 2, p. 221-238.
- Moon, M.J.; Oh, D.Y.; Moon, J.S.; Kim, D.K.; Hwang, J.I.; Lee, J.Y.; Kim, J.I.; Cho, S.; Kwon, H.B. and Seong, J.Y., 2007, Cloning and activation of the bullfrog apelin receptor: Gi/o coupling and high affinity for [Pro1]apelin-13: *Mol.Cell. Endocrinol.*, v. 277, no. 1-2, p. 51-60.
- Moore, R. Y., and V. B. Eichler, 1972, Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat: *Brain Res.*, v. 42, no. 1, p. 201-206.
- Morrison, S. F., and K. Nakamura, 2011, Central neural pathways for thermoregulation: *Front Biosci.*, v. 16, p. 74-104.
- Morton, G. J., D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh, and M. W. Schwartz, 2006, Central nervous system control of food intake and body weight: *Nature*, v. 443, no. 7109, p. 289-295.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays: *J.Immunol.Methods*, v. 65, no. 1-2, p. 55-63.
- Navarrete, M., and A. Araque, 2008, Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication: *Neuron*, v. 57, no. 6, p. 883-893.
- Naylor, A. M., W. D. Ruwe, A. F. Kohut, and W. L. Veale, 1985, Perfusion of vasopressin within the ventral septum of the rabbit suppresses endotoxin fever: *Brain Res.Bull.*, v. 15, no. 2, p. 209-213.
- Nelson, R. J., 2005, Effects of nitric oxide on the HPA axis and aggression: *Novartis.Found.Symp.*, v. 268, p. 147-160.
- Newson, M. J., E. M. Roberts, G. R. Pope, S. J. Lolait, and A. M. O'Carroll, 2009, The effects of apelin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis neuroendocrine function are mediated through corticotrophin-releasing factor- and vasopressin-dependent mechanisms: *J.Endocrinol.*, v. 202, no. 1, p. 123-129.
- O'Carroll, A. M., A. L. Don, and S. J. Lolait, 2003, APJ receptor mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: regulation by stress and glucocorticoids: *J.Neuroendocrinol.*, v. 15, no. 11, p. 1095-1101.

- O'Carroll, A. M., T. L. Selby, M. Palkovits, and S. J. Lolait, 2000, Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1492, no. 1, p. 72-80.
- O'Donnell, L. A., A. Agrawal, P. Sabnekar, M. A. Dichter, D. R. Lynch, and D. L. Kolson, 2007, Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury: *J.Neurochem.*, v. 102, no. 6, p. 1905-1917.
- O'Dowd, B.F.; Heiber, M.; Chan, A.; Heng, H.H.; Tsui, L.C.; Kennedy, J.L.; Shi, X.; Petronis, A.; George, S.R. and Nguyen, T., 1993, A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11: *Gene*, v. 136, no. 1-2, p. 355-360.
- O'Shea, M., M. J. Hansen, K. Tatemoto, and M. J. Morris, 2003, Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat: *Nutr.Neurosci.*, v. 6, no. 3, p. 163-167.
- Oldfield, B. J., E. Badoer, D. K. Hards, and M. J. McKinley, 1994, Fos production in retrogradely labelled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II: *Neuroscience*, v. 60, no. 1, p. 255-262.
- Oldfield, B. J., R. J. Bicknell, R. M. McAllen, R. S. Weisinger, and M. J. McKinley, 1991a, Intravenous hypertonic saline induces Fos immunoreactivity in neurons throughout the lamina terminalis: *Brain Res.*, v. 561, no. 1, p. 151-156.
- Oldfield, B. J., R. R. Miselis, and M. J. McKinley, 1991b, Median preoptic nucleus projections to vasopressin-containing neurones of the supraoptic nucleus in sheep. A light and electron microscopic study: *Brain Res.*, v. 542, no. 2, p. 193-200.
- Orlando, G. F., K. Langnaese, R. Landgraf, M. G. Spina, G. Wolf, and M. Engelmann, 2007, Neural nitric oxide gene inactivation affects the release profile of oxytocin into the blood in response to forced swimming: *Nitric Oxide*, v. 16, no. 1, p. 64-70.
- Ott, D., J. Murgott, S. Rafalzik, F. Wuchert, B. Schmalenbeck, J. Roth, and R. Gerstberger, 2010, Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines: *Brain Res.*, v. 1363, p. 93-106.
- Overington, J. P., B. Al-Lazikani, and A. L. Hopkins, 2006, How many drug targets are there?: *Nat.Rev.Drug Discov.*, v. 5, no. 12, p. 993-996.
- Palmer, R. M., D. S. Ashton, and S. Moncada, 1988, Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine: *Nature*, v. 333, no. 6174, p. 664-666.
- Paredes, R. M., J. C. Etzler, L. T. Watts, W. Zheng, and J. D. Lechleiter, 2008, Chemical calcium indicators: *Methods*, v. 46, no. 3, p. 143-151.
- Pascual, O.; Casper, K.B.; Kubera, C.; Zhang, J.; Revilla-Sanchez, R.; Sul, J.Y.; Takano, H.; Moss, S.J.; McCarthy, K. and Haydon, P.G., 2005, Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks: *Science*, v. 310, no. 5745, p. 113-116.
- Patel, N. K., S. Javed, S. Khan, M. Papouchado, A. L. Malizia, A. E. Pickering, and J. F. Paton, 2011, Deep brain stimulation relieves refractory hypertension: *Neurology*, v. 76, no. 4, p. 405-407.

- Patronas, P., M. Horowitz, E. Simon, and R. Gerstberger, 1998, Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration: *Brain Res.*, v. 798, no. 1-2, p. 127-139.
- Paxinos, G. and Watson, C., 2005, The rat brain in stereotaxic coordinates- the new coronal set: Elsevier Academic Press. 5th Edition
- Perea, G., and A. Araque, 2005, Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes: *J.Neurosci.*, v. 25, no. 9, p. 2192-2203.
- Pirkmajer, S., and A. V. Chibalin, 2011, Serum starvation: caveat emptor: *Am.J.Physiol. Cell Physiol.*, v. 301, no. 2, p. C272-C279.
- Pitkin, S. L., J. J. Maguire, T. I. Bonner, and A. P. Davenport, 2010, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function: *Pharmacol.Rev.*, v. 62, no. 3, p. 331-342.
- Pittman, Q. J., H. W. Blume, and L. P. Renaud, 1981, Connections of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal gray: an electrophysiological study in the rat: *Brain Res.*, v. 215, no. 1-2, p. 15-28.
- Plata-Salaman, C. R., Y. Oomura, and Y. Kai, 1988, Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system: *Brain Res.*, v. 448, no. 1, p. 106-114.
- Porter, J. T., and K. D. McCarthy, 1996, Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals: *J.Neurosci.*, v. 16, no. 16, p. 5073-5081.
- Porter, J. T., and K. D. McCarthy, 1997, Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo: *Prog.Neurobiol.*, v. 51, no. 4, p. 439-455.
- Puffer, B.A.; Sharron, M.; Coughlan, C.M.; Baribaud, F.; McManus, C.M.; Lee, B.; David, J.; Price, K.; Horuk, R.; Tsang, M. and Doms, R.W., 2000, Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses: *Virology*, v. 276, no. 2, p. 435-444.
- Pumain, R., I. Kurcewicz, and J. Louvel, 1987, Ionic changes induced by excitatory amino acids in the rat cerebral cortex: *Can.J.Physiol. Pharmacol.*, v. 65, no. 5, p. 1067-1077.
- Pyner, S., 2009, Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation: *J.Chem.Neuroanat.*, v. 38, no. 3, p. 197-208.
- Rajora, N., G. Boccoli, D. Burns, S. Sharma, A. P. Catania, and J. M. Lipton, 1997, Alpha-MSH modulates local and circulating tumor necrosis factor-alpha in experimental brain inflammation: *J.Neurosci.*, v. 17, no. 6, p. 2181-2186.
- Rawson, C. L., D. T. Loo, J. R. Duimstra, O. R. Hedstrom, E. E. Schmidt, and D. W. Barnes, 1991, Death of serum-free mouse embryo cells caused by epidermal growth factor deprivation: *J.Cell Biol.*, v. 113, no. 3, p. 671-680.
- Reaux, A., M. N. De, I. Skultetyova, Z. Lenkei, M. S. El, K. Gallatz, P. Corvol, M. Palkovits, and C. Llorens-Cortes, 2001, Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain: *J.Neurochem.*, v. 77, no. 4, p. 1085-1096.

Reaux, A., K. Gallatz, M. Palkovits, and C. Llorens-Cortes, 2002, Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain: *Neuroscience*, v. 113, no. 3, p. 653-662.

Reaux-Le Goazigo A., L. Bodineau, M. N. Picco-DE, L. Jeandel, N. Chartrel, C. Knauf, C. Raad, P. Valet, and C. Llorens-Cortes, 2011, Apelin and the proopiomelanocortin system: A new regulatory pathway of hypothalamic α -MSH release: *Am.J.Physiol. Endocrinol.Metab.* Nov; 301(5):E955-66.

Reaux-Le Goazigo A., A. Morinville, A. Burlet, C. Llorens-Cortes, and A. Beaudet, 2004, Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons: *Endocrinology*, v. 145, no. 9, p. 4392-4400.

Reaux-Le, G. A., R. vear-Perez, P. Zizzari, J. Epelbaum, M. T. Bluët-Pajot, and C. Llorens-Cortes, 2007, Cellular localization of apelin and its receptor in the anterior pituitary: evidence for a direct stimulatory action of apelin on ACTH release: *Am.J.Physiol. Endocrinol.Metab.*, v. 292, no. 1, p. E7-E15.

Rene, F., D. Monnier, C. Gaiddon, J. M. Felix, and J. P. Loeffler, 1996, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide transduces through cAMP/PKA and PKC pathways and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in mouse melanotropes: *Neuroendocrinology*, v. 64, no. 1, p. 2-13.

Riediger, T., P. Giannini, E. Erguven, and T. Lutz, 2006, Nitric oxide directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus: *Brain Res.*, v. 1125, no. 1, p. 37-45.

Rivier, C., and G. H. Shen, 1994, In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 beta, vasopressin, and oxytocin: *J.Neurosci.*, v. 14, no. 4, p. 1985-1993.

Roberts, E. M., M. J. Newson, G. R. Pope, R. Landgraf, S. J. Lolait, and A. M. O'Carroll, 2009, Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice: *J.Endocrinol.*, v. 202, no. 3, p. 453-462.

Roberts, E. M., G. R. Pope, M. J. Newson, R. Landgraf, S. J. Lolait, and A. M. O'Carroll, 2010, Stimulus-specific neuroendocrine responses to osmotic challenges in apelin receptor knockout mice: *J.Neuroendocrinol.*, v. 22, no. 4, p. 301-308.

Roberts-Thomson, P. J., and K. Shepherd, 1990, Molecular size heterogeneity of immunoglobulins in health and disease: *Clin.Exp.Immunol.*, v. 79, no. 3, p. 328-334.

Rodrigo, J., D. R. Springall, O. Uttenthal, M. L. Bentura, F. badia-Molina, V. Riveros-Moreno, R. Martinez-Murillo, J. M. Polak, and S. Moncada, 1994, Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain: *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, v. 345, no. 1312, p. 175-221.

Ross, G., T. Hubschle, U. Pehl, H. A. Braun, K. Voigt, R. Gerstberger, and J. Roth, 2003, Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins: *J.Appl.Physiol.*, v. 94, no. 4, p. 1395-1402.

Roth, J., 2006, Endogenous antipyretics: *Clin.Chim.Acta*, v. 371, no. 1-2, p. 13-24.

- Roth, J., E. M. Harre, C. Rummel, R. Gerstberger, and T. Hubschle, 2004, Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs: *Front Biosci.*, v. 9, p. 290-300.
- Rowland, N. E., 1998, Brain mechanisms of mammalian fluid homeostasis: insights from use of immediate early gene mapping: *Neurosci.Biobehav.Rev.*, v. 23, no. 1, p. 49-63.
- Sanchez, F., J. R. Alonso, R. Arevalo, E. Blanco, J. Aijon, and R. Vazquez, 1994, Coexistence of NADPH-diaphorase with vasopressin and oxytocin in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat: *Cell Tissue Res.*, v. 276, no. 1, p. 31-34.
- Saper, C. B., and D. Levisohn, 1983, Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region: *Brain Res.*, v. 288, no. 1-2, p. 21-31.
- Sawchenko, P. E., and L. W. Swanson, 1983, The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat: *J.Comp. Neurol.*, v. 218, no. 2, p. 121-144.
- Scalia, F., and S. S. Winans, 1975, The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals: *J.Comp. Neurol.*, v. 161, no. 1, p. 31-55.
- Scammell, T. E., J. K. Elmquist, and C. B. Saper, 1996, Inhibition of nitric oxide synthase produces hypothermia and depresses lipopolysaccharide fever: *Am.J.Physiol.*, v. 271, no. 2 Pt 2, p. R333-R338.
- Schmidt, H. H., H. Nau, W. Wittfoht, J. Gerlach, K. E. Prescher, M. M. Klein, F. Niroomand, and E. Bohme, 1988, Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide: *Eur.J.Pharmacol.*, v. 154, no. 2, p. 213-216.
- Schreckenberger, R., G. Taimor, H. M. Piper, and K. D. Schluter, 2004, Inhibition of Ca²⁺-dependent PKC isoforms unmasks ERK-dependent hypertrophic growth evoked by phenylephrine in adult ventricular cardiomyocytes: *Cardiovasc.Res.*, v. 63, no. 3, p. 553-560.
- Sharp, F. R., S. M. Sagar, K. Hicks, D. Lowenstein, and K. Hisanaga, 1991, C-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress: *J.Neurosci.*, v. 11, no. 8, p. 2321-2331.
- Sheikh, A.Y.; Chun, H.J.; Glassford, A.J.; Kundu, R.K.; Kutschka, I.; Ardigo, D.; Hendry, S.L.; Wagner, R.A.; Chen, M.M.; Ali, Z.A.; Yue, P.; Huynh, D.T.; Connolly, A.J.; Pelletier, M.P.; Tsao, P.S.; Robbins, R.C. and Quertermous, T., 2008, In vivo genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure: *Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.*, v. 294, no. 1, p. H88-H98.
- Siddiquee, K., J. Hampton, S. Khan, D. Zadory, L. Gleaves, D. E. Vaughan, and L. H. Smith, 2011, Apelin protects against angiotensin II-induced cardiovascular fibrosis and decreases plasminogen activator inhibitor type-1 production: *J.Hypertens.*, v. 29, no. 4, p. 724-731.
- Silverman, A. J., D. L. Hoffman, and E. A. Zimmerman, 1981, The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN): *Brain Res.Bull.*, v. 6, no. 1, p. 47-61.

- Simon, E., 2000, Interface Properties of Circumventricular Organs in Salt and Fluid Balance: *News Physiol. Sci.*, v. 15, p. 61-67.
- Simpkin, J. C., D. M. Yellon, S. M. Davidson, S. Y. Lim, A. M. Wynne, and C. C. Smith, 2007, Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury: *Basic Res. Cardiol.*, v. 102, no. 6, p. 518-528.
- Sorhede, W. M., C. Magnusson, and B. Ahren, 2005, The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice: *Regul. Pept.*, v. 131, no. 1-3, p. 12-17.
- Srisawat, R., V. R. Bishop, P. M. Bull, A. J. Douglas, J. A. Russell, M. Ludwig, and G. Leng, 2004, Regulation of neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in the rat magnocellular neurosecretory system: *Neurosci. Lett.*, v. 369, no. 3, p. 191-196.
- Stal'nenko, E. S., N. A. Kurchenko, and N. S. Sukachev, 1969, [Method of measuring arterial pressure in rats in chronic experiment]: *Biull. Eksp. Biol. Med.*, v. 68, no. 7, p. 124-125.
- Steinert, J. R., T. Chernova, and I. D. Forsythe, 2010, Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia: *Neuroscientist.*, v. 16, no. 4, p. 435-452.
- Stephan, F. K., and I. Zucker, 1972, Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 69, no. 6, p. 1583-1586.
- Sudhof, T. C., 2011, Calcium Control of Neurotransmitter Release: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
- Sun, X., S. Iida, A. Yoshikawa, R. Senbonmatsu, K. Imanaka, K. Maruyama, S. Nishimura, T. Inagami, and T. Senbonmatsu, 2011, Non-activated APJ suppresses the angiotensin II type 1 receptor, whereas apelin-activated APJ acts conversely: *Hypertens. Res.*, v. 34, no. 6, p. 701-706.
- Sunter, D., A. K. Hewson, and S. L. Dickson, 2003, Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat: *Neurosci. Lett.*, v. 353, no. 1, p. 1-4.
- Swanson, L. W., 2003, The amygdala and its place in the cerebral hemisphere: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 985, p. 174-184.
- Swanson, L. W., and G. D. Petrovich, 1998, What is the amygdala?: *Trends Neurosci.*, v. 21, no. 8, p. 323-331.
- Szokodi, I.; Tavi, P.; Foldes, G.; Voutilainen-Myllyla, S.; Ilves, M.; Tokola, H.; Pikkarainen, S.; Piuholta, J.; Rysa, J.; Toth, M. and Ruskoaho, H., 2002, Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility: *Circ. Res.*, v. 91, no. 5, p. 434-440.
- Taheri, S.; Murphy, K.; Cohen, M.; Sujkovic, E.; Kennedy, A.; Dhillon, W.; Dakin, C.; Sajedi, A.; Ghatei, M. and Bloom, S., 2002, The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 291, no. 5, p. 1208-1212.

- Takayama, K., H. Iwazaki, M. Hirabayashi, K. Yakabi, and S. Ro, 2008, Distribution of c-Fos immunoreactive neurons in the brain after intraperitoneal injection of apelin-12 in Wistar rats: *Neurosci.Lett.*, v. 431, no. 3, p. 247-250.
- Tanabe, Y., A. Nomura, M. Masu, R. Shigemoto, N. Mizuno, and S. Nakanishi, 1993, Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4: *J.Neurosci.*, v. 13, no. 4, p. 1372-1378.
- Tanious, F. A., J. M. Veal, H. Buczak, L. S. Ratmeyer, and W. D. Wilson, 1992, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites: *Biochemistry*, v. 31, no. 12, p. 3103-3112.
- Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M.X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Kurokawa, T.; Onda, H. and Fujino, M., 1998, Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 251, no. 2, p. 471-476.
- Tatemoto, K., K. Takayama, M. X. Zou, I. Kumaki, W. Zhang, K. Kumano, and M. Fujimiya, 2001, The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism: *Regul.Pept.*, v. 99, no. 2-3, p. 87-92.
- ter Horst, G. J., and P. G. Luiten, 1986, The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat: *Brain Res.Bull.*, v. 16, no. 2, p. 231-248.
- Thompson, R. H., N. S. Canteras, and L. W. Swanson, 1996, Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat: *J.Comp. Neurol.*, v. 376, no. 1, p. 143-173.
- Thrasher, T. N., and L. C. Keil, 1987, Regulation of drinking and vasopressin secretion: role of organum vasculosum laminae terminalis: *Am.J.Physiol.*, v. 253, no. 1 Pt 2, p. R108-R120.
- Tobin, V. A., P. M. Bull, S. Arunachalam, A. M. O'Carroll, Y. Ueta, and M. Ludwig, 2008, The effects of apelin on the electrical activity of hypothalamic magnocellular vasopressin and oxytocin neurons and somatodendritic peptide release: *Endocrinology*, v. 149, no. 12, p. 6136-6145.
- Tohyama, M., Takatsuji, K., and Katsuji, K., 1998, M.Tohyama, K.Takatsuji, and K.Katsuji Atlas of Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat: Oxford University Press. 1st Edition.
- Tollner, B., J. Roth, B. Storr, D. Martin, K. Voigt, and E. Zeisberger, 2000, The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide: *Pflugers Arch.*, v. 440, no. 6, p. 925-932.
- Travis, K. A., and A. K. Johnson, 1993, In vitro sensitivity of median preoptic neurons to angiotensin II, osmotic pressure, and temperature: *Am.J.Physiol.*, v. 264, no. 6 Pt 2, p. R1200-R1205.
- Tsien, R. Y., T. J. Rink, and M. Poenie, 1985, Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths: *Cell Calcium*, v. 6, no. 1-2, p. 145-157.

Ullian, M. E., C. N. Beck, L. P. Walker, W. R. Fitzgibbon, and T. A. Morinelli, 2009, Thiol antioxidants regulate angiotensin II AT1 and arginine vasopressin V1 receptor functions differently in vascular smooth muscle cells: *Am.J.Hypertens.*, v. 22, no. 2, p. 221-227.

Ulrich-Lai, Y. M., and J. P. Herman, 2009, Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses: *Nat.Rev.Neurosci.*, v. 10, no. 6, p. 397-409.

Ulrich-Lai, Y. M., K. R. Jones, D. R. Ziegler, W. E. Cullinan, and J. P. Herman, 2011, Forebrain origins of glutamatergic innervation to the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus: differential inputs to the anterior versus posterior subregions: *J.Comp Neurol.*, v. 519, no. 7, p. 1301-1319.

Valle, A., N. Hoggard, A. C. Adams, P. Roca, and J. R. Speakman, 2008, Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice: *J.Neuroendocrinol.*, v. 20, no. 1, p. 79-84.

van den Pol, A. N., X. B. Gao, K. Obrietan, T. S. Kilduff, and A. B. Belousov, 1998, Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin: *J.Neurosci.*, v. 18, no. 19, p. 7962-7971.

Ventura, R. R., A. Giusti-Paiva, D. A. Gomes, L. L. Elias, and J. Antunes-Rodrigues, 2005, Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats: *Neurosci.Lett.*, v. 379, no. 2, p. 75-80.

Verbalis, J. G., 2007, How does the brain sense osmolality?: *J.Am.Soc.Nephrol.*, v. 18, no. 12, p. 3056-3059.

Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; Godbout, K.; Parsons, T.; Baronas, E.; Hsieh, F.; Acton, S.; Patane, M.; Nichols, A. and Tummino, P., 2002, Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 17, p. 14838-14843.

Villar, M. J., S. Ceccatelli, M. Ronnqvist, and T. Hökfelt, 1994, Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study: *Brain Res.*, v. 644, no. 2, p. 273-281.

Vincent, S. R., and H. Kimura, 1992, Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain: *Neuroscience*, v. 46, no. 4, p. 755-784.

v.Berridge M., An S.Tan, Kathy D.McCoy, and Rui Wang, 1996, The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts: *Biochemica*, v. 4, no. 4-96, p. 14-19.

von Hirsch T., and J. Peiffer, 1955, [Histological methods in differential diagnosis of leukodystrophy from lipoidosis]: *Arch.Psychiatr.Nervenkr.Z.Gesamte Neurol.Psychiatr.*, v. 194, no. 1, p. 88-104.

Wang, C., J. F. Du, F. Wu, and H. C. Wang, 2008, Apelin decreases the SR Ca^{2+} content but enhances the amplitude of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient and contractions during twitches in isolated rat cardiac myocytes: *Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.*, v. 294, no. 6, p. H2540-H2546.

Wang, G.; Anini, Y.; Wei, W.; Qi, X.; OCarroll, A.M.; Mochizuki, T.; Wang, H.Q.; Hellmich, M.R.; Englander, E.W. and Greeley, G.H., Jr., 2004, Apelin, a new enteric peptide:

localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion: *Endocrinology*, v. 145, no. 3, p. 1342-1348.

Watts, A. G., and L. W. Swanson, 1987, Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat: *J.Comp. Neurol.*, v. 258, no. 2, p. 230-252.

Watts, A. G., L. W. Swanson, and G. Sanchez-Watts, 1987, Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat: *J.Comp. Neurol.*, v. 258, no. 2, p. 204-229.

Wheeler, D. B., A. Randall, and R. W. Tsien, 1994, Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission: *Science*, v. 264, no. 5155, p. 107-111.

Whitnall, M. H., E. Mezey, and H. Gainer, 1985, Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles: *Nature*, v. 317, no. 6034, p. 248-250.

Wuchert, F., D. Ott, J. Murgott, S. Rafalzik, N. Hitzel, J. Roth, and R. Gerstberger, 2008, Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide: *J.Neuroimmunol.*, v. 204, no. 1-2, p. 66-74.

Wuchert, F., D. Ott, S. Rafalzik, J. Roth, and R. Gerstberger, 2009, Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema: *J.Neuroimmunol.*, v. 206, no. 1-2, p. 44-51.

Xie, H.; Tang, S.Y.; Cui, R.R.; Huang, J.; Ren, X.H.; Yuan, L.Q.; Lu, Y.; Yang, M.; Zhou, H.D.; Wu, X.P.; Luo, X.H. and Liao, E.Y., 2006, Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts: *Regul.Pept.*, v. 134, no. 2-3, p. 118-125.

Xu, N., H. Wang, L. Fan, and Q. Chen, 2009, Supraspinal administration of apelin-13 induces antinociception via the opioid receptor in mice: *Peptides*, v. 30, no. 6, p. 1153-1157.

Yamaguchi, K., and T. Yamada, 2006, Involvement of anteroventral third ventricular AMPA/kainate receptors in both hyperosmotic and hypovolemic AVP secretion in conscious rats: *Brain Res.Bull.*, v. 71, no. 1-3, p. 183-192.

Yamamoto, T.; Habata, Y.; Matsumoto, Y.; Yasuhara, Y.; Hashimoto, T.; Hamajyo, H.; Anayama, H.; Fujii, R.; Fuse, H.; Shintani, Y. and Mori, M., 2011, Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1810, no. 9, p. 853-862.

Yuste, R., and L. C. Katz, 1991, Control of postsynaptic Ca^{2+} influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters: *Neuron*, v. 6, no. 3, p. 333-344.

Zaretskaia, M. V., D. V. Zaretsky, A. Shekhar, and J. A. DiMicco, 2002, Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats: *Brain Res.*, v. 928, no. 1-2, p. 113-125.

Zeng, X. J., S. P. Yu, L. Zhang, and L. Wei, 2010, Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons: *Exp.Cell Res.*, v. 316, no. 11, p. 1773-1783.

- Zeng, X. J., L. K. Zhang, H. X. Wang, L. Q. Lu, L. Q. Ma, and C. S. Tang, 2009, Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat: *Peptides*, v. 30, no. 6, p. 1144-1152.
- Zhang, K., W. G. Mayhan, and K. P. Patel, 1997, Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity: *Am.J.Physiol.*, v. 273, no. 3 Pt 2, p. R864-R872.
- Zhang, W., N. Zhang, T. Sakurai, and T. Kuwaki, 2009, Orexin neurons in the hypothalamus mediate cardiorespiratory responses induced by disinhibition of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: *Brain Res.*, v. 1262, p. 25-37.
- Zhong, J. C., X. Y. Yu, Y. Huang, L. M. Yung, C. W. Lau, and S. G. Lin, 2007, Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice: *Cardiovasc.Res.*, v. 74, no. 3, p. 388-395.
- Zhou, N., X. Fan, M. Mukhtar, J. Fang, C. A. Patel, G. C. DuBois, and R. J. Pomerantz, 2003, Cell-cell fusion and internalization of the CNS-based, HIV-1 co-receptor, *APJ: Virology*, v. 307, no. 1, p. 22-36.
- Zhu, B., and J. Herbert, 1997, Angiotensin II interacts with nitric oxide-cyclic GMP pathway in the central control of drinking behaviour: mapping with c-fos and NADPH-diaphorase: *Neuroscience*, v. 79, no. 2, p. 543-553.

F. Publikationen

- 2009 Hatzelmann T., Ott D., Gerstberger R., Functional analysis of apelin receptor protein APJ in the rat hypothalamic PVN and MnPO. *In: 19. Symposium d. Fachgr. Physiol. und Bioch. der Dt. Veterinärmed. Gesell.; p. 76 Verlag DVG Service, Giessen*
- 2010 Hatzelmann T., Ott D., Marks D., Gerstberger R., Functional expression of the apelin-12 receptor protein APJ in rat hypothalamic nuclei (PVN and MnPO) involved in body fluid homeostasis and temperature regulation. *Acta Physiol. 195 (Suppl): 130*
- 2010 Hatzelmann T., Ott D., Gerstberger R., Functional analysis of apelin receptor protein APJ in the rat hypothalamic PVN and MnPO. *Poster: 7th International Congress of Neuroendocrinology; Rouen Frankreich*
- 2012 Hatzelmann T., Ott D., Gerstberger R., Apelin modulates glutamate-induced intracellular calcium signaling in non-nitregic neurons and astrocytes of the rat PVN and MnPO. *Journal of Neuroendocrinology; In Vorbereitung*
- 2012 Hatzelmann T., Roth. J., Gerstberger R., Antipyretic effects of [Pyr1]apelin13 on LPS-induced fever. *Regulatory Peptides; In Vorbereitung*

E. Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calciumkonzentration
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
7TM	Sieben transmembranal
Abb.	Abbildung
ACE2	<i>Angiotensin converting enzyme 2</i>
aCSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
aMnPO	Anteriorer <i>Nucleus praeopticus medianus</i>
AMPA-Rezeptor	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
AMPS	Ammonium Persulfat
AngII	Angiotensin II
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Ap	Apelin
Ap12	Apelin12
APJ-G	APJ Antikörper <i>host goat</i>
APJ-R	APJ Antikörper <i>host rabbit</i>
ARC	<i>Nucleus arcuatus</i>
ARCL	Lateraler Bereich des <i>Nucleus arcuatus</i>
ARCM	Medialer Bereich des <i>Nucleus arcuatus</i>
AS	Aminosäure(n)
AT1a	Angiotensin II Rezeptor Typ1A
AVP	Vasopressin
BAT	<i>brown adipose tissue</i>
Bidest	entionisiertes Wasser
BNST	<i>Bed Nucleus of stria terminalis</i>
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
ChP	<i>Plexus choroideus</i>
CLIP	<i>Corticotropin-like intermediate peptide</i>
CNPase	<i>2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CORT	Corticosteron
CpU	<i>Caudate putamen</i>
CRF	<i>Corticotropin-releasing-factor</i>
CT-Wert	<i>Cycle threshold</i>
CVO	Circumventrikuläres Organ
Cy3	<i>Cyanine 3</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMC	<i>Nucleus dorsomedialis hypothalami pars centralis</i>
DMD	<i>Nucleus dorsomedialis hypothalami pars dorsalis</i>

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMH	<i>Nucleus dorsomedialis hypothalami</i>
dMnPO	Dorsaler <i>Nucleus praeopticus medianus</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dV III	Dorsaler 3. Ventrikel
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EC50	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Erg.	Verweis auf Kapitel aus Ergebnisteil
ERK1/2	<i>Extracellular regulated kinase 1/2</i>
f	<i>Fornix</i>
Fc-Komponente	Fragment <i>crystallizable</i> -Komponente
FCS	fetales Kälberserum
Fura-2AM	<i>Fura-2-acetoxymethyl ester</i>
g	Gramm
G	Gauge
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBSS	<i>Gey's Balanced Salt Solution</i>
GDP	Guanosintriphosphat
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
Gi	Inhibitorisches G-Protein
Glut	Glutamat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
H+L	<i>Heavy + Light chains</i>
Hab	<i>Habenula</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HEK293	<i>Human embryonic kidney</i> Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperaziny)-Ethansulfonsäure
HHL	Hypophysenhinterlappen
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HRP	Meerrettichperoxidase
HVL	Hypophysenvorderlappen
HZL	Hypophysenzwischenlappen
i.c.v.	Intracerebroventrikulär
I.kU.	Internationale kilo Einheiten
i.p.	Intraperitoneal
I.U.	Internationale Einheiten
i.v.	Intravenös
IBAT	Intrascapulares braunes Fettgewebe
IgG	Immunglobulin

IL-6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IR	Immunreaktivität
k.o.	<i>Knock out</i>
Kap.	Kapitel
Kard./Kardiom.	Kardiomyozyten
KCl	Kaliumchlorid
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
L-NAME	L-NG-Nitroarginin Methylester
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Lateralventrikel
mA	Milliampere
MAP	<i>Microtubule-associated protein</i>
MAP-Kinasen	Mitogen-activated protein-Kinasen
Mc	MnPO-angereicherten neurogliale Primärkultur
ME	<i>Eminentia mediana</i>
MEE	<i>Zona externa der Eminentia mediana</i>
MEI	<i>Zona interna der Eminentia mediana</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGluR (1-8)	Metabotrope Glutamatrezeptoren
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MM	Molekularmasse
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MnPO	<i>Nucleus praeopticus medianus</i>
MPA	<i>Area praeopticus medianus</i>
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonucleinsäure
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH-d	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Diaphorase
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBA	Neurobasal A
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS-M	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase Antikörper <i>host mouse</i>
nNOS-R	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase <i>host rabbit</i>

NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
NST	Zitterfreie Wärmebildung
O ₂	Sauerstoff
oc	<i>Chiasma opticum</i>
OD	Optische Dichte
opt	<i>Tractus opticus</i>
OVL _T	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
p44/42	<i>Extracellular regulated kinase 1/2</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PaLM	<i>Nucleus paraventricularis hypothalami pars magnocellularis</i>
PaMP	<i>Nucleus paraventricularis hypothalami pars parvocellularis</i>
PaV	<i>Nucleus paraventricularis hypothalami pars periventricularis</i>
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PBS-T	Phosphatgepufferte Saline mit TritonX100
Pc	PVN-angereicherte neurogliale Primärkultur
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLC - PKC	Phospholipase C- Proteinkinase C
POMC	Proopiomelanocortin
PrC	<i>Nucleus praecommissuralis</i>
Ptx	Pertussistoxin
PVA	<i>Nucleus paraventricularis thalami</i>
PVG	Periventrikuläres „Grau“
PVN	<i>Nucleus paraventricularis hypothalami</i>
PyrAp13	Pyroglutamyliertes Apelin13
Gq	Pertussistoxin-insensitives G-Protein
R	Ratiowerte
rAPJ	Antikörper gegen APJ-Sequenz der Ratte
RAS	Renin-Angiotensin-System
RF	<i>Retention factor</i>
RGB-Bild	Rot-Grün-Blau Bild
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	<i>Radiation per minute</i>
RTqPCR	<i>Real time quantitative polymerase chain reaction</i>
s.c.	<i>Subcutan</i>
S.E.M.	<i>Standard error of the mean</i>
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde(n)
SFO	<i>Organum subfornicale</i>
SON	<i>Nucleus supraopticus</i>
SOR	<i>Nucleus supraopticus pars rostralis</i>

Std.	Stunde(n)
STLD	Posteriorer Teils der <i>lateralen Division</i> des <i>Bed Nucleus</i> der <i>Stria terminalis</i>
STMA	anteriore Komponente der <i>medialen Division</i> des <i>Bed Nucleus</i> der <i>Stria terminalis</i>
STMV	ventrale Komponente der medialen Division des <i>Bed Nucleus</i> der <i>Stria terminalis</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosfaktor α
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
U/min	Umdrehungen pro Minute
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
V	Volt
V III	Dritter Ventrikel
V1b-Rezeptor	Vasopressin Rezeptor 1b
VMH	Ventromedialer Hypothalamus
vMnPO	Ventraler <i>Nucleus praeopticus medianus</i>
VMPO	<i>Nucleus praeopticus ventromedialis</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
Δ	Delta
ΔT_b	Veränderung der Körperkerntemperatur

G. Danksagung

Consummatum est... deshalb Danke an die vielen Leute die mit zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

- Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit mit jederzeit Rat, Tat und Unterstützung.
- Bei Prof. Dr. Gerhard Heldmaier möchte ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und die Betreuung als externer Doktorand außerhalb des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg bedanken.
- Dr. Sibylle Wenzel: Vielen Dank für die Durchführung der zahlreichen ERK1/2 Western Blots mit meinen Proben.
- Dr. Paulus Wohlfahrt von Aventis Frankfurt (a.M.) danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und die Kooperation zur Durchführung der qRT-PCR für Apelin und APJ in Frankfurt.
- Vielen Dank auch an Prof. Dr. Susanne Önel und Prof. Dr. Andreas Brune für die Bereitschaft der Teilnahme an meiner Prüfungskommission.
- Daniela Ott, bzw. „Frau Ott“ alias der TA und „Mutti“ für alle Fälle danke ich besonders für die Zusammenarbeit und Unterstützung in so vielfältiger Weise auf sowohl professioneller als auch persönlicher Ebene.
- Jolanta Murgot danke ich für die große Unterstützung bei der Durchführung der Bioassays, Doreen Marks für ihre Hilfe bei den OPs und Bärbel Reuter für ihre Hilfe bei immunhistochemischen Markierungen.
- Danke an Prof. Dr. Joachim Roth und Dr. Christoph Rummel für ihre stetige Hilfsbereitschaft vor allem auch beim Korrekturlesen.
- Weiterer Dank gilt natürlich dabei auch den anderen fleißigen Korrekturlesern.
- Auch ein ganz großes Dankeschön nach Südafrika an Dr. Lois Harden für ihre schnelle Hilfe, immer wenn es mal wieder hieß: „Lois I need your help!“
- Danke an meine Bürokollegin und „Office buddy“ Jelena Damm und meinen „Lab buddy“ Florian Wiegand.
- Danke an die Tierpfleger für die Versorgung der Versuchstiere und auch mal einer Kuh.
- Danke an die Werkstatt für die schnelle Lösung technischer Probleme jeder Art.
- Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern und Freunden für ihre großartige Unterstützung bedanken.

Einen großen Dank auch an die vielen lieben Kollegen und Kolleginnen für ihre große Unterstützung und die einmalige super (Arbeits-)atmosphäre am Institut.

Abschließend gilt mein größter Dank natürlich Anja für ihre großartige Unterstützung jeglicher Art und ihr Verständnis.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Thomas Hatzelmann
geboren am	19.02.1979 in München

Ausbildung

04/08-12/11 **Justus-Liebig-Universität Giessen, *Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie***

- Dissertation: Betreuer Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger
- Thema: Immunhistochemische, zellbiologische und physiologische *in vivo* Untersuchungen zum Apelin/APJ-System in Hypothalamus und Hypophyse der Ratte

04/07 - 10/07 **University of Otago, Dunedin, Neuseeland, *Centre for Neuro-endocrinology, Medical School, Department of Anatomy and Structural Biology***

03/07 **Philipps-Universität Marburg, Diplomabschluss**

10/01- 03/07 **Philipps-Universität Marburg, Diplomstudiengang: Biologie**

- Hauptfächer: Genetik, Virologie und Tierphysiologie
- Diplomarbeit: Betreuer Prof. Dr. Martin Klingenspor
- Thema: Chromatinstruktur und Histonmodifikationen im Torpor: Ein Mechanismus der globalen Transkriptionsregulation?“

06/99- 08/00 ***Up with People;* Internationales Musik-, Austausch- und Bildungsprogramm**

1989 - 1998 **Gymnasium Geretsried**